



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Elisa Ribeiro Miranda Antunes

Variabilidade sazonal da composição química e atividade antioxidante de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae) e seus híbridos.

Seasonal variation of the chemical composition and antioxidant activity of leaf extracts of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, *Maytenus aquifolium* Mart (Celastraceae) and their hybrids.

Campinas,
2019

Elisa Ribeiro Miranda Antunes

Variabilidade sazonal da composição química e atividade antioxidante de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae) e seus híbridos.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de mestra em Biologia Vegetal.

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ELISA
RIBEIRO MIRANDA ANTUNES E
ORIENTADA PELA PROF. DRA.
ALEXANDRA CHRISTINE HELENA
FRANKLAND SAWAYA.

Orientadora: Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Campinas
2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2017/00155-5
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9392-2677>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Antunes, Elisa Ribeiro Miranda, 1993-
An89v Variabilidade sazonal da composição química e atividade antioxidante de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae) e seus híbridos / Elisa Ribeiro Miranda Antunes. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Maytenus*. 2. Espinheira santa. 3. Espectrometria de massa. 4. Atividade antioxidante. I. Sawaya, Alexandra Christine Helena Frankland, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Seasonal variation of the chemical composition and antioxidant activity of leaf extracts of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae) and their hybrid

Palavras-chave em inglês:

Maytenus

Maytenus ilicifolia

Mass spectrometry

Antioxidant activity

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestra em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya [Orientador]

Sara Adrián López de Andrade

Alessandra Sussulini

Data de defesa: 04-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 04 de Fevereiro de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Prof^a. Dra. Sara Adrián López de Andrade

Prof^a. Dra. Alessandra Sussulini

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

– Marie Curie

AGRADECIMENTOS

A meus pais que durante toda a minha vida sempre me apoiaram, desde o momento que escolhi prestar Biologia, durante minha Iniciação Científica e Mestrado e inclusive durante às idas ao laboratório nos fins de semana e feriados.

Ao Giovane, por todo o amor, por sempre acreditar em mim e me apoiar. Por me estimular na busca dos meus sonhos e objetivos e por fazer parte da minha vida.

A minha avó Maria, que sempre me incentiva e me pergunta como estão os meus estudos.

Aos meus grandes e eternos amigos de graduação Fernanda, Caroline, Giuliana, Pedro, Antônio e Ana Beatriz pela amizade, companheirismo e apoio.

Aos colegas e amigos do laboratório em especial à Bel, Guilherme, Mara, Vanessa, Rodolfo, Mariana e Alexandre pelas conversas, convivências, ajudas em experimentos, ida a congressos e amizade, que durará para sempre.

À professora Dra. Alexandra Sawaya por todas as conversas, orientação, ensinamentos, paciência e dedicação.

À FAPESP/CAPES, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro, sob número de processo 2017/00155-5..

Ao CPQBA, em especial ao Ílio, pelo fornecimento das amostras de Espinheira Santa, por toda ajuda e apoio.

À UNICAMP por toda infraestrutura, em especial ao Instituto de Biologia, onde iniciei meus estudos de Graduação e onde agora, finalizo meu Mestrado.

Ao laboratório do professor Dr. Marcelo Lancellotti pelas análises antimicrobianas e ao professor Dr. Marcelo Menossi e ao Pedro pelas análises antioxidantes.

À Andressa pela grande ajuda durante as análises de ORAC. Sem ela estaríamos perdidas para essa análise.

À CEPAGRI-UNICAMP (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas aplicada à Agricultura) pelo fornecimento dos dados meteorológicos.

À todos que direta e indiretamente me ajudaram ao longo do meu mestrado,

Muito Obrigada!

RESUMO

As espécies, *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*, popularmente conhecidas como “Espinheira Santa”, são largamente utilizadas na medicina tradicional brasileira para tratar gastrites e dispepsias. Vários estudos comprovaram que tais espécies possuem atividade gastroprotetora e antiulcerogênica, cuja ação pode estar relacionada à suas propriedades antioxidantes. De acordo com alguns estudos, a elevada produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ocasiona alterações celulares graves caracterizando um quadro de estresse oxidativo. Portanto, o comprometimento do sistema de defesa antioxidante, tem sido associado à patogênese da lesão da mucosa gástrica relacionada ao estresse. Porém, para obter um fitoterápico de alta qualidade e propor critérios de padronização é imprescindível conhecer a variabilidade química da espécie vegetal utilizada como matéria prima. Com relação às flutuações sazonais na composição química do gênero *Maytenus*, há apenas um estudo na literatura no qual se observou que na primavera a planta apresentou maior teor de flavonóides e fenóis totais enquanto que no inverno apresentou maior teor de triterpenos. O presente trabalho visou identificar possíveis variações sazonais da composição química dos extratos destas espécies e seus híbridos. Para isso, foram realizadas coletas de folhas de 5 indivíduos de *M. ilicifolia*, de *M. aquifolium* e híbridos resultantes do cruzamento de ambas, mensalmente ao longo de um ano. Seus extratos foram analisados via cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS) e foram submetidos à testes de atividade antioxidante por DPPH e ORAC. Através dos resultados obtidos foi possível concluir que a diferença química entre as espécies foi mais acentuada que eventuais diferenças sazonais. Os indivíduos híbridos analisados, por sua vez, apresentaram maior semelhança morfológica, química e biológica com a espécie *M. aquifolium*. Além disso, foram observadas mudanças na intensidade de 4 *features*, que apresentaram maiores intensidades nos meses de outubro e maio. Tais variações podem ser resultado de variações climáticas nos meses em questão ou resposta ao dano sofrido por alguns indivíduos e a consequente sinalização entre plantas, capaz, inclusive, de alterar a composição química de indivíduos não submetidos à poda. Todas as amostras demonstraram acentuada atividade antioxidante, sendo *M. ilicifolia* mais eficiente nos ensaios de DPPH e *M. aquifolium* nos ensaios de ORAC_{FL} mostrando que diferenças na composição interferem na eficiência antioxidante, dependendo do mecanismo em questão.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*, *Maytenus aquifolium*, espinheira santa, UHPLC-MS, antioxidante

ABSTRACT

The species *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, commonly known as “Espinheira Santa” are widely used in Brazilian traditional medicine for treatment of gastritis and dyspepsia. Several studies have confirmed that both species have gastroprotective and antiulcerogenic activities, whose action may be related to their antioxidant properties. According to some studies, the high production of reactive oxygen and nitrogen species, cause severe cellular alterations, characterizing a state of oxidative stress. Therefore, the impairment of the antioxidant defense system has been associated with the pathogenesis of stress-related lesion of the gastric mucosa. However, to obtain a high quality phytotherapeutic and to propose a standardization criteria, it is essential to know the chemical variability of the species used as raw material. Regarding the seasonal variations in the chemical composition of the *Maytenus* genus, there is only one study in the literature in which it was observed that during the spring the plants presented higher levels of flavonoids and total phenols, while in winter, they presented higher levels of triterpenes. The present work aimed to identify possible seasonal variations on the chemical composition of the leaf extracts of these species and their hybrid. For this, leaf samples were collected from 5 individual of of *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* and their hybrid, monthly over a year. The leaf extracts were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS) and submitted to antioxidant tests of DPPH and ORAC_{FL}. Through the results obtained it was possible to conclude that the chemical difference between the species were more pronounced than possible seasonal variations. The hybrid, however, presented more chemical, biological and morphological similarities with the species *M. aquifolium*. Furthermore, differences in 4 features were observed, which demonstrated higher intensities in the months of October and May. Such variations may be the result of climate variations in the months in question or the response to damage and the signaling between plants, capable of altering the chemical composition of the individuals not pruned. All the samples demonstrated accentuated antioxidant activity, with *M. ilicifolia* as the most efficient on the DPPH assays and *M. aquifolium* on the ORAC_{FL} assays, showing that differences in composition interfere on the antioxidant efficiency, depending on the assay's mechanism.

keywords: *Maytenus ilicifolia*, *Maytenus aquifolium*, espinheira santa, UHPLC-MS, antioxidant.

Lista de ilustrações

Figura 1. <i>Workflow</i> de Metabolômica	21
Figura 2. Cromatogramas UHPLC-MS típicos dos extratos das duas espécies e do híbrido analisados, com ionização em modo positivo (ESI+).	28
Figura 3. Cromatogramas UHPLC-MS típicos dos extratos das das duas espécies e do híbrido analisadosm com ionização em modo negativo (ESI-).	29
Figura 4. PCA com os agrupamentos das amostras analisadas por UHPLC-MS dos extratos das espécies <i>M. ilicifolia</i> , <i>M. aquifolium</i> , híbridas e QCs	32
Figura 5. Biplot do PCA indicando as <i>features</i> responsáveis pelas separações observadas.	33
Figura 6. Intensidades médias de cada <i>feature</i> por cada as duas espécies de Espinheira Santa e seu híbrido. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão (n=120). ($p \leq 0,05$).	35
Figura 7. Intensidades médias de cada <i>feature</i> por cada as duas espécies de Espinheira Santa e seu híbrido. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão (n=120). ($p \leq 0,05$).	36
Figura 8. PCA com amostras analisadas por UHPLC-MS dos extratos da espécie <i>M. ilicifolia</i> . Biplot em Anexo 2	38
Figura 9. PCA com amostras analisadas por UHPLC-MS dos extratos da espécie <i>M. aquifolium</i> . Biplot em Anexo 3	39
Figura 10. PCA com amostras analisadas por UHPLC-MS dos extratos dos indivíduos híbridos. Biplot em Anexo 4	40
Figura 11. Variação de intensidade média e erro padrão das <i>features</i> válidas por mês nos indivíduos da espécie <i>M. ilicifolia</i> . Os asteriscos indicam diferença significativa peloteste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão (n=10) ($p \leq 0,05$).	42
Figura 12. Variação de intensidade média e erro padrão das <i>features</i> válidas com valor $p \leq 0,05$ por mês nos indivíduos da espécie <i>M. aquifolium</i> . Os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão (n=10). ($p \leq 0,05$).	43

Figura 13. Variação de intensidade média e erro padrão das <i>features</i> válidas com valor $p \leq 0,05$ por mês nos indivíduos Híbridos. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão (n=10). ($p \leq 0,05$).	44
Figura 14. Variação de intensidade da <i>feature</i> M289T2, mês a mês nos cinco indivíduos de <i>M. ilicifolia</i> . Os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão (n=2). ($p \leq 0,05$).	45
Figura 15. Médias mensais da Radiação Incidente, Pluviosidade e Temperatura durante o ano de coleta	51
Figura 16. Reação de oxirredução do DPPH na presença de quercetina.....	60

Lista de tabelas e quadros

Tabela 1. Datas das coletas realizadas.....	24
Tabela 2. <i>Features</i> observadas nas análises de LC-MS dos extratos das duas espécies de <i>Maytenus</i> e suas híbridas. Rt (tempo de retenção), <i>m/z</i> (relação massa/carga do composto).....	30
Tabela 3. Valores de massa de alta resolução, identificações propostas e referências das <i>features</i> detectadas em extratos de folhas de Espinheira Santa. Afz→afzelequina ou epiafzelequina; Cat→catequina ou epicatequina; Gall→galocatequina or epigallocatequina; Rha→rhamnose; Ara→arabinose; Kaemp→kaempferol; Hex→glucose ou galactose	47
Tabela 4. EC ₅₀ dos extratos das folhas das três espécies de Espinheira Santa e do padrão Quercetina. Menores valores de EC ₅₀ indicam maior atividade antioxidante.	63
Tabela 5. EC ₅₀ dos extratos do caule das três espécies de Espinheira Santa e do padrão Quercetina. Menores valores de EC ₅₀ indicam maior atividade antioxidante.	64
Tabela 6. Equivalência de Trolox dos extratos de.....	66
Tabela 7. Equivalência de Trolox dos extratos dos caules das espécies de Espinheira Santa pelo ensaio ORAC. Maiores valores de equivalência indicam maior atividade antioxidante.....	66

Lista de abreviaturas e siglas

AAPH – cloreto de (2,2'-azobis (2-amidiopropano)

ABTS – 2,2'-azino-bis

ANOVA – Análise de Variância

CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EC50 – Concentração efetiva 50%

ESI – Ionização por eletrospray

ET – Transferência de elétrons

GC – cromatografia gasosa

GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

HAT – Transferência de átomos de hidrogênio

HPLC-MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

KW/m² – kilowatts/metro quadrado

LC – cromatografia líquida

LC-MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

m/z – relação massa/carga

MS – espectrometria de massas

NAPRALERT[®] – base de dados de produtos naturais, incluindo informações etnomédicas, farmacológicas e bioquímicas.

ORAC_{FL} – Oxygen Radical Absorbance Capacity

PAL – fenilalanina amônia liase

PC – Componente principal

PCA – Análise de componentes principais

QC – Controle de Qualidade

ROS – Espécie reativa de Oxigênio

Rt – Tempo de retenção

TE – Trolox equivalente

TQD – Triplo Quadrupolo

UHPLC-MS – cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

UV – ultra violeta

UV-B – Raio Ultravioleta tipo B

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	15
1. Parte 1 – Metabolômica	17
1.1. INTRODUÇÃO	19
1.2. OBJETIVO	23
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
1.3.1. <i>Material vegetal e Sazonalidade.....</i>	<i>24</i>
1.3.2. <i>Preparação dos extratos.....</i>	<i>25</i>
1.3.3. <i>Análise por UHPLC-MS de baixa resolução.....</i>	<i>25</i>
1.3.4. <i>Análise por UHPLC-MS de alta resolução</i>	<i>26</i>
1.3.5. <i>Estatística.....</i>	<i>26</i>
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
1.4.1. <i>Material Vegetal e Sazonalidade.....</i>	<i>27</i>
1.4.2. <i>Preparação dos Extratos.....</i>	<i>27</i>
1.4.3. <i>Análise por LC-MS.....</i>	<i>27</i>
1.4.4. <i>Análise metabolômica e estatística de todas as amostras.</i>	<i>29</i>
1.4.5. <i>Análise metabolômica e estatística das amostras por espécie</i>	<i>37</i>
1.5. CONCLUSÃO	54
2. Parte 2 – Atividade Biológica.....	55
3.1. INTRODUÇÃO	56
3.2. OBJETIVO	59
3.3. MATERIAIS E METODOS.....	60
3.3.1. <i>Preparação dos extratos</i>	<i>60</i>
3.3.2. <i>Atividade antioxidante por DPPH.....</i>	<i>60</i>
3.3.3. <i>Atividade antioxidante por ORAC_{FL}</i>	<i>61</i>
3.3.4. <i>Estatística.....</i>	<i>62</i>
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.4.1. <i>Atividade Antioxidante por DPPH</i>	<i>63</i>
3.4.2. <i>Atividade Antioxidante por ORAC_{FL}</i>	<i>65</i>
3.5. CONCLUSÃO	68
Conclusão Geral	69
Perspectivas Futuras.....	70
Referências Bibliográficas	71
Anexo.....	81

Introdução Geral

Tradicionalmente, a principal estratégia do homem no tratamento de doenças foi o uso de plantas, cujos registros possivelmente datam de 60.000 anos atrás ¹. Apenas recentemente, com a evolução da química e da tecnologia, o homem conseguiu reduzir sua dependência do reino vegetal, que, entretanto, continua sendo uma importante fonte de ingredientes ativos para a produção de medicamentos e permanece sendo largamente utilizada pela população ².

Uma planta muito empregada na medicina popular brasileira é a “Espinheira Santa”, cujo nome abrange predominantemente, espécies do gênero *Maytenus*, destacando-se a *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss e *Maytenus aquifolium* Mart. Este gênero, o principal dentro da Família Celastraceae, conta com 200 espécies e é considerado um gênero pantropical, concentrado na América do Sul ³. As espécies *M. aquifolium* e *M. ilicifolia* são nativas da região sul e sudeste do Brasil, sendo a primeira mais adaptada a climas mais quentes ⁴.

As espécies da família Celastraceae geralmente se apresentam como árvores, arbustos ou lianas ⁵. No caso de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*, ambas as espécies ocorrem na forma de arbusto ou árvore, com folhas glabras de textura coriácea ou cartácea cuja margem serreada apresenta espinhos que podem variar de tamanho. As flores se dispõem em fascículos multifloros e os frutos são bivalvares e orbiculares.

As principais diferenças entre os indivíduos de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* é que a primeira geralmente apresenta uma altura menor, cujo máximo é em torno de 5 m, frutos monospermicos e espinhos marginais maiores, enquanto a segunda possui tamanho máximo de 12 m, frutos dispérmicos e espinhos marginais ligeiramente menores ².

Popularmente, a Espinheira Santa é utilizada principalmente para o tratamento gastrites e dispepsias. A atividade gastroprotetora e antiulcerogênica de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* foi comprovada inúmeras vezes na literatura e tais efeitos medicinais têm sido relacionados com suas propriedades antioxidantes ⁶⁻¹³.

De acordo alguns estudos, o sistema de defesa antioxidante nas plantas e animais tem a finalidade de evitar que o acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocasione danos celulares no organismo. O comprometimento deste sistema de defesa no reino animal tem sido correlacionado com inúmeras afecções gástricas como gastrites, úlceras e

carcinomas que podem ser prevenidas e tratadas com substâncias antioxidantes¹¹⁻¹³.

Tais efeitos na mucosa gástrica não são causados por um único princípio ativo presente na planta e sim por grupo de compostos, provavelmente agindo sinergicamente. Sabe-se que as plantas do gênero *Maytenus* possuem inúmeras substâncias, dentre elas: terpenos e triterpenos, óleos essenciais, taninos (principalmente condensados), glicolipídios, flavonóis e alcalóides¹⁴⁻²¹.

De acordo com Pereira *et al.* (1993) e Ming *et al.* (1998)^{22,23}, tanto os taninos, principalmente a epigallocatequina, quanto os terpenoides – destacando-se o fridenelol – são responsáveis, parcialmente, por seus efeitos gastroprotetores. Por outro lado, no estudo de Leite *et al.* (2010)²⁴, os glicosídeos de canferol, isolados dos extratos etanólicos e aquosos de *M. ilicifolia* demonstraram atividade sobre o volume e o pH da secreção gástrica, sendo de grande importância para o efeito gastroprotetor.

Porém, infelizmente, apesar das plantas medicinais constituírem uma importante fonte de novos medicamentos não há preocupação com a conservação das espécies. Em 1976, uma missão financiada pelo US National Cancer Institute coletou 27.215 kg de *Maytenus* no Quênia – toda a população adulta da espécie no país – para uso em seu programa de desenvolvimento de medicamentos contra o câncer^{2,25}. No Brasil, por exemplo, a espécie *M. ilicifolia* está atualmente em risco de extinção devido ao seu uso indiscriminado²⁶.

Assim, com a finalidade de poupar os indivíduos selvagens e potencializar a produção do fitoterápico, é necessário o desenvolvimento de técnicas agrícolas específicas para o cultivo de cada espécie medicinal. Entretanto, uma vez que a alta qualidade do medicamento não é atingida apenas na etapa final, a identificação, cultivo, colheita e armazenamento corretos da espécie vegetal são essenciais para uma boa produção e necessitam de um estudo detalhado²⁷.

Neste aspecto, as etapas que merecem bastante atenção, além da correta identificação da espécie, são as condições de cultivo e a época de colheita, uma vez que a concentração dos princípios ativos se modifica dependendo das condições naturais como temperatura, umidade e luminosidade²⁸ e das condições de coleta, como danos físicos gerados na poda²⁹⁻³³. Com relação à essas diferenças químicas, já foram relatadas na literatura alterações na quantidade de taninos presentes nas folhas de diversas espécies dependendo da luminosidade recebida, do ano em que o material foi coletado ou das condições do ambiente em geral²⁸.

Assim, para propor critérios de padronização de medicamentos fitoterápicos é essencial conhecer a variabilidade na composição química da espécie vegetal utilizada como matéria prima ³⁴. Neste aspecto, técnicas de metabolômica *untargeted* utilizando estratégias baseadas em análises por LC-MS, por exemplo, são particularmente importantes para pesquisas com plantas, por possuírem uma grande riqueza de metabólitos, na sua maioria semi-polares, que podem ser detectados e separados por esta técnica ^{35,36}.

Com relação às flutuações sazonais na composição química do gênero *Maytenus* há apenas um estudo na literatura realizado com a espécie *M. aquifolium*, no qual Yariwake *et al.* (2005) ³⁴ observaram mudanças na concentração de fenóis totais, triterpenos totais e flavonóides totais. Neste trabalho, observou-se que as plantas apresentaram maior teor de flavonóides e fenóis totais durante a primavera, enquanto que no inverno apresentaram maior teor de triterpenos ³⁴. Porém, tal estudo acompanhou a variação sazonal apenas por análises genéricas de absorbância, que não distinguem componentes individuais dos extratos.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a composição química dos extratos de exemplares de *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e de indivíduos híbridos resultantes do cruzamento de ambas as espécies, ao longo de um ano, via cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS). A atividade antioxidante foi avaliada através de ensaios antioxidantes de DPPH e ORAC_{FL}, visando futuramente obter fitoterápicos mais padronizados para o tratamento de distúrbios gástricos.

Parte 1 - Metabolômica

1.1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos são compostos orgânicos de baixa massa molecular, que podem ser caracterizados como reagentes, intermediários ou produtos do metabolismo de diversos organismos^{37,38}. Diferentemente dos genes, transcritos e proteínas, os metabólitos não são codificados diretamente no genoma, mas servem como marcadores da atividade bioquímica. Por esta razão, o estudo dos metabólitos tem se mostrado uma ferramenta útil para caracterizar amostras biológicas e relacionar atividade molecular com fenótipo^{39,40}.

Estima-se que o reino vegetal possua aproximadamente 200.000 metabólitos diferentes, muitos dos quais são responsáveis pela sobrevivência das espécies em diferentes nichos ecológicos e condições ambientais, além de proporcionar matéria prima para a indústria alimentícia ou farmacêutica^{41,42}. Tais compostos são conhecidos como metabólitos secundários e são produzidos a partir de vias bioquímicas derivadas do metabolismo primário, sendo largamente distribuídos no reino vegetal, especialmente nas plantas vasculares⁴³.

Os metabólitos secundários são frequentemente referidos como responsáveis pela manutenção dos processos biológicos nas plantas e diversos estudos demonstraram que estes possuem um importante papel na defesa contra patógenos e herbívoros⁴⁴, conferem proteção contra estresse ambiental⁴³ e contribuem para os odores e colorações específicos das plantas⁴⁵. A acumulação de compostos fenólicos e fenilpropanóides, por exemplo, é altamente influenciada por estresse nutricional, ataques de patógenos, radiação UV, temperatura e presença de herbicidas^{46,47}.

Apesar dos metabólitos serem alvo de pesquisa desde meados de 1980, somente em 2001, o termo “metabolômica” foi criado e utilizado para descrever tais estudos⁴⁴. A metabolômica tem como finalidade identificar e quantificar os metabólitos dentro de um sistema biológico (metaboloma) e tem se mostrado uma técnica versátil, amplamente utilizada pela indústria e pela ciência, em diversas áreas biológicas, como medicina, toxicologia, nutrição, dentre outras^{43,48}. A área passou por progressos notáveis dentro da última década e implementou novas ferramentas que possibilitam correlacionar mudanças bioquímicas e fenótipo, sendo aplicada com sucesso, por exemplo, na análise do fenótipo químico de plantas em resposta a condições ambientais⁴⁹⁻⁵².

O metaboloma pode ser analisado através de duas estratégias: *targeted* e *untargeted*. A metabolômica do tipo *targeted* se refere ao método no qual uma lista específica de metabólitos é mensurada e analisada, tipicamente focando em uma ou mais rotas metabólicas previamente definidas. A metabolômica do tipo *untargeted*, por sua vez, aplica métodos de análise global da composição química e tem o objetivo de mensurar, simultaneamente, a maior quantidade de metabólitos possíveis, dentro de uma amostra biológica⁵⁰.

Os estudos na área de metabolômica tipicamente seguem uma sequência de passos ou processos, denominada de *workflow*. A Figura 1 representa graficamente os passos envolvidos nas pesquisas metabolômicas: iniciando com a pergunta biológica, em seguida o desenho experimental, a aquisição e préprocessamento dos dados, finalizando com as análises estatísticas; para permitir possíveis identificações químicas e obter uma interpretação biológica dos resultados obtidos.

Uma vez que o desenho experimental tenha sido propriamente definido, o passo seguinte envolve aquisição dos dados. A plataforma analítica e a forma de extração dos compostos de interesse deve ser escolhida em de acordo com as exigências da amostra. Entretanto, devido à grande diversidade de metabólitos presentes no reino vegetal, em diferentes concentrações, não há, atualmente, um método analítico capaz de extrair e detectar todos os compostos em uma dada amostra vegetal⁵³. Dos 200.000 metabólitos diferentes presentes nas plantas, menos de um quarto tiveram suas estruturas moleculares elucidadas⁵⁴. Felizmente, novos avanços na área de metabolômica, como técnicas hifenadas e de alta resolução de espectrometria de massas têm contribuído para o estudo destes componentes⁵⁵⁻⁵⁷.

Uma das principais técnicas para geração de dados em metabolômica de plantas é a espectrometria de massas (MS), utilizada no presente trabalho. A espectrometria de massas é amplamente empregada devido à sua sensibilidade, rapidez e ampla aplicação e tem a finalidade de determinar a razão massa/carga (m/z) e a abundância dos íons dos compostos das amostras³⁶.

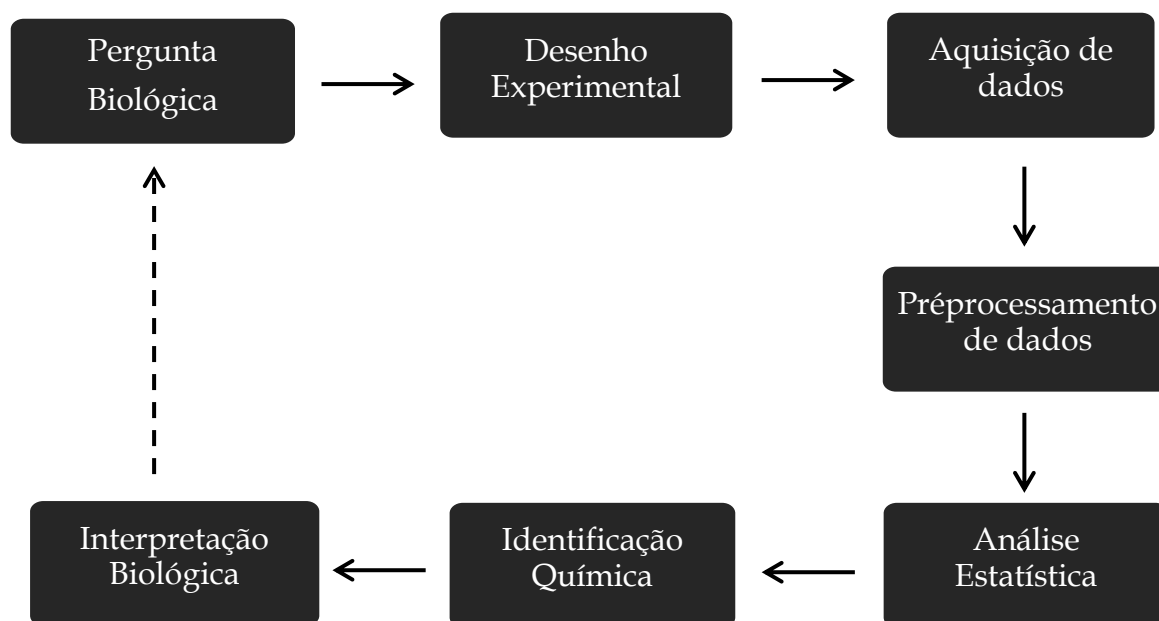


Figura 1. *Workflow* de Metabolômica

Para isso, três componentes são fundamentais no equipamento: fonte de ionização, analisador de massas e detector ⁵⁸. Para que a análise ocorra, a amostra é inicialmente introduzida ao espectrômetro de massas por infusão direta ou cromatografia. Dependendo do tipo de extrato utilizado, a Cromatografia Gasosa (GC) ou a Cromatografia Líquida (LC) são mais comumente aplicadas para separações dos metabólitos de interesse, antes destes serem detectados pelo espectrometro de massas ³⁶. Estratégias baseadas em análises por LC-MS, por exemplo, são particularmente importantes para pesquisas com plantas, uma vez que o reino vegetal possui uma grande riqueza de compostos metabólitos, na sua maioria semi-polares, que podem ser detectados e separados pela técnica de LC-MS ^{35,36}. Após a separação por LC, os compostos são direcionados à ionização por eletrospray, no qual ocorre a transferência de íons de uma solução para fase gasosa, formando um “spray” eletrostático. Para isso, é necessária uma fonte de alta tensão (1000 a 7000V) em contato com a solução, que será bombeada através de um capilar, sendo ionizada. Os íons formados serão então selecionados, de acordo com o potencial de ionização utilizado.

Para os estudos de metabolômica *untargeted*, após a aquisição dos dados, o préprocessamento tem se tornado um prérequisito essencial devido à complexidade dos dados gerados. O préprocessamento tem como objetivo identificar, com precisão, os íons detectados e converter os dados brutos em tabelas de picos, sendo realizado através de vários passos, que incluem filtragem, detecção de *features*, alinhamento e normalização ⁵⁹.

Os métodos de filtragem processam os dados brutos a fim de remover ruídos e determinar a linha de base. A detecção de *features* tem a finalidade de identificar os sinais gerados por íons reais, evitando detecção de falsos positivos como adutos e moléculas duplicadas. O alinhamento dos picos, por sua vez, corrige os tempos de retenção entre as corridas cromatográficas agrupando os dados de diversas amostras. A normalização tem como objetivo remover viés indesejado nas medições de sinais dos íons mantendo as variações biológicas de interesse ⁵⁹.

Uma vez préprocessados, os dados obtidos devem ser, a seguir, analisados por métodos estatísticos apropriados, sendo a PCA (Principal Component Analysis) o método mais comumente utilizado ⁶⁰. A PCA é uma análise exploratória multivariada que se baseia na redução dos dados às dimensões ou componentes. A maior variação entre as amostras pode ser observada no primeiro componente ou PC1, a segunda maior variação, no segundo componente (PC2) e assim por diante. A PCA é utilizada para explorar as relações entre as amostras e tem como objetivo revelar os fatores mais importantes responsáveis pela variabilidade entre elas, caracterizando o conjunto de dados ⁶⁰.

Um dos principais desafios da metabolômica, principalmente se tratando de métodos baseados em LC-MS, é a identificação dos metabólitos e sua elucidação estrutural, essenciais para obter significado biológico associado às *features* detectadas no estudo metabolômico ^{60,61}. Devido à grande variação nos padrões de fragmentação para diferentes tipos de instrumentos utilizados, não é possível comparar diferentes espectros, sendo possível realizar a identificação apenas com a utilização de padrões analíticos. Desta forma, grande esforço tem sido direcionado na última década para tornar este processo mais eficiente e barato ⁶⁰.

Por fim, a interpretação biológica dos resultados é o passo que demanda maior tempo e recurso uma vez que a função dos metabólitos é diretamente relacionada às vias metabólicas que, uma vez determinadas, possibilitam interpretações biológicas dos resultados obtidos ⁶¹.

Baseado nisso, este trabalho descreve um estudo de metabolômica *untargeted*, com a finalidade de verificar as alterações no metaboloma de duas espécies de Espinheira Santa – *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium* – e de indivíduos híbridos derivados de seu cruzamento, em amostras coletadas ao longo de um ano. O *workflow* descrito anteriormente foi implementado para as análises, nas quais foi utilizado equipamento de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplado à espectrometria de massas (UHPLC-MS).

1.2. OBJETIVO

Avaliar a variação na composição química dos extratos de folhas de *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e da população híbrida derivada do cruzamento de ambas as espécies por LC-MS e metabolômica *untargeted* ao longo de um ano.

1.3. MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1. Material vegetal e Sazonalidade

Foram utilizadas folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss, *Maytenus aquifolium* Mart. e da população híbrida derivada do cruzamento de ambas as espécies, localizadas no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em Paulínia (SP). Os indivíduos híbridos foram cultivados ativamente, após observada a hibridização natural entre *M.ilicifolia* e *M. aquifolium* no campo experimental do CPQBA.

Os indivíduos de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* estavam dispostos em fileiras, com espaçamento de 4 x 4 metros entre cada planta, porém, devido ao acentuado crescimento da copa, apresentavam contato entre os ramos de diferentes indivíduos. Os indivíduos híbridos, por sua vez, estavam isolados em relação aos parentais, também dispostos em fileiras, com espaçamento de 4 x 2 metros.

Cada espécie e o híbrido foram amostrados por 5 indivíduos. As coletas foram realizadas preferencialmente na penúltima semana do mês, a partir do dia 20, sempre no período da manhã, por volta das 9h (Tabela 1).

Tabela 1. Datas das coletas realizadas

COLETA	Data
1	29/11/2016
2	20/12/2016
3	25/01/2017
4	22/02/2017
5	21/03/2017
6	26/04/2017
7	24/05/2017
8	21/06/2017
9	26/07/2017
10	23/08/2017
11	26/09/2017
12	25/10/2017

As folhas foram coletadas sempre dos mesmos indivíduos, mensalmente durante um ano, em alturas diferentes ao redor de toda a planta. Logo após a coleta, as folhas foram congeladas e mantidas em freezer a -80 °C e depois liofilizadas e trituradas. Ao término do ciclo de coletas foram realizadas as extrações aquosas e análise por UHPLC-MS.

Os dados meteorológicos do ano de coleta (Novembro de 2016 a Outubro de 2017) foram obtidos da Estação Meteorológica CEPAGRI –UNICAMP (22°48'56"S, 47°03'28"W, 664 m), e com os dados de temperatura, radiação incidente e pluviosidade foram plotados gráficos com as médias mensais.

1.3.2. Preparação dos extratos

Após testes preliminares para determinação do método analítico foi padronizado o preparo dos extratos das folhas da seguinte forma: 20 mg de folhas liofilizadas para 10 mL de água purificada Milli-Q, com maceração assistida por ultrassom por 30 minutos. Estes extratos foram analisados por UHPLC-MS.

1.3.3. Análise por UHPLC-MS de baixa resolução

Para as análises cromatográficas foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência–UPLC® Acquity da Waters acoplado com um espectrômetro de massas TQD Acquity com fonte de ESI, utilizando uma coluna C18 BEH Acquity Waters (1,7µm x 2,1mm x 50mm) com temperatura do forno em 30°C e um gradiente de fase móvel utilizando 0.1% ácido fórmico em água purificada (A) e acetonitrila (B).

As condições do gradiente de fase móvel foram: 95% A e 5% B no início da corrida, 75% A e 25% B em 4 minutos, 50% A e 50% B em 6,10 minutos, 1% A e 99% B em 6,20 minutos, retornando para 95% A e 5% B em 8,50 minutos, estabilizando até 10 minutos, tudo em vazão de 200 µL/min.

Os espectros de massa foram obtidos com ionização por eletrospray em modo negativo (ESI-) nas seguintes condições: Capilar à 4.00 kV, Cone à 25 V, Extrator à 3 V, temperatura da fonte à 150 °C, temperatura de dessolvatação à 250 °C.

1.3.4. Análise por UHPLC-MS de alta resolução

Para auxiliar na identificação de compostos encontrados nos extratos, foram também realizadas análises em aparelho de espectrometria de massas de alta resolução, utilizando-se Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência–UHPLC[®] da Agilent. A coluna e as condições cromatográficas foram as mesmas usadas com nas análises de baixa resolução. Os espectros de massas foram obtidos com ionização por eletrospray em modo negativo no Q-TOF da Agilent na faixa entre m/z 50 e 1000, nas seguintes condições: capilar 3,5 KV, voltagem do cone 320 V e vazão do gás 12 L/min, temperatura de gás de nebulização 290 °C, temperaturas de gás de dessolvatação 350 °C.

1.3.5. Estatística

Os cromatogramas e espectros obtidos por UHPLC-MS foram préprocessados e alinhados através do software XCMS Online e desta forma foram obtidos *features* identificados inicialmente pelo seu tempo de retenção e valor de massa carga (m/z) do composto, para cada espécie de Espinheira Santa. Utilizando valores de intensidade (decorrentes da área do pico) de cada *feature* foi possível realizar Análises de Componentes Principais multivariada (PCA), utilizando o software online MetaboAnalyst e testes one-way ANOVA e Tukey através do software GraphPad 6.

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1. Material Vegetal e Sazonalidade

Durante o primeiro período deste trabalho foram realizadas todas as 12 coletas propostas no projeto como constam na Tabela 1. Foram coletadas amostras de 5 indivíduos de cada espécie e da população híbrida, mensalmente, totalizando 180 amostras durante o ano. As excisatas de *Maytenus ilicifolia*, *Maytenus aquifolium* e Híbridas foram depositadas no Herbário do Instituto de Biologia – Unicamp, sob códigos UEC199156, UEC199157 e UEC199158, respectivamente. Além disso, o projeto de pesquisa foi devidamente registrado na plataforma SisGen, como exigido pela Lei nº 13.123.

Logo após as coletas, como previsto no projeto, as plantas foram congeladas a -80°C, liofilizadas e trituradas, sendo mantidas em local fresco e seco, até o dia das análises cromatográficas, que ocorreram no mês de Dezembro de 2017.

1.4.2. Preparação dos Extratos

A preparação dos extratos e as análises por UHPLC-MS foram realizadas utilizando-se o método analítico previamente otimizado pelo grupo de pesquisa. Através de testes preliminares, verificou-se que a proporção de folhas e líquido extrator indicada na Farmacopéia Brasileira de 3 g para 150 mL, era demasiadamente concentrada para análises cromatográficas, saturando o solvente.

Desta forma, todos os extratos analisados por UHPLC-MS foram preparados utilizando-se 20 mg de folhas liofilizadas e trituradas para 10 mL de água purificada Milli-Q, com apenas uma extração por 30 minutos em sonificador e filtradas para análise via UHPLC-MS.

1.4.3. Análise por UHPLC-MS

Durante o desenvolvimento do método, foram testados outros solventes analíticos como metanol e água purificada com 0,1% (v/v) de hidróxido de amônio. Porém, foi observado que tanto com a utilização de metanol quanto acetonitrila não havia modificação na resolução e na separação cromatográfica, e foi preferido o uso do solvente acetonitrila devido à menor pressão no sistema. Com relação à água purificada com 0,1% (v/v) de hidróxido de amônio (água básica), foi observado uma piora na resolução cromatográfica e, por isso, foi determinado o uso de água purificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (água ácida).

Os espectros de massa foram adquiridos em modo Full Scan (m/z 100 a 1500), com ionização por eletrospray modo negativo (ESI-) nas condições descritas no item **Error! Reference source not found.** **Error! Reference source not found.** MATERIAL E MÉTODOS.

A escolha pela ionização em modo negativo (ESI-) foi pautada em análises prévias, nas quais foram feitas comparações entre os diferentes modos de ionização. Foi observado que os cromatogramas e os espectros em modo positivo (ESI+) eram pouco reprodutíveis e os compostos presentes nos extratos eram pouco ionizados, se comparados com a ionização em modo negativo (ESI-) (Figura 2 e Figura 3, respectivamente). Tal resultado corrobora com o observado em outros estudos, nos quais foi verificado que a composição das espécies do gênero *Maytenus*, é predominantemente formada por flavonóides e compostos fenólicos, de caráter ácido, cuja ionização é maior em modo negativo ⁶².

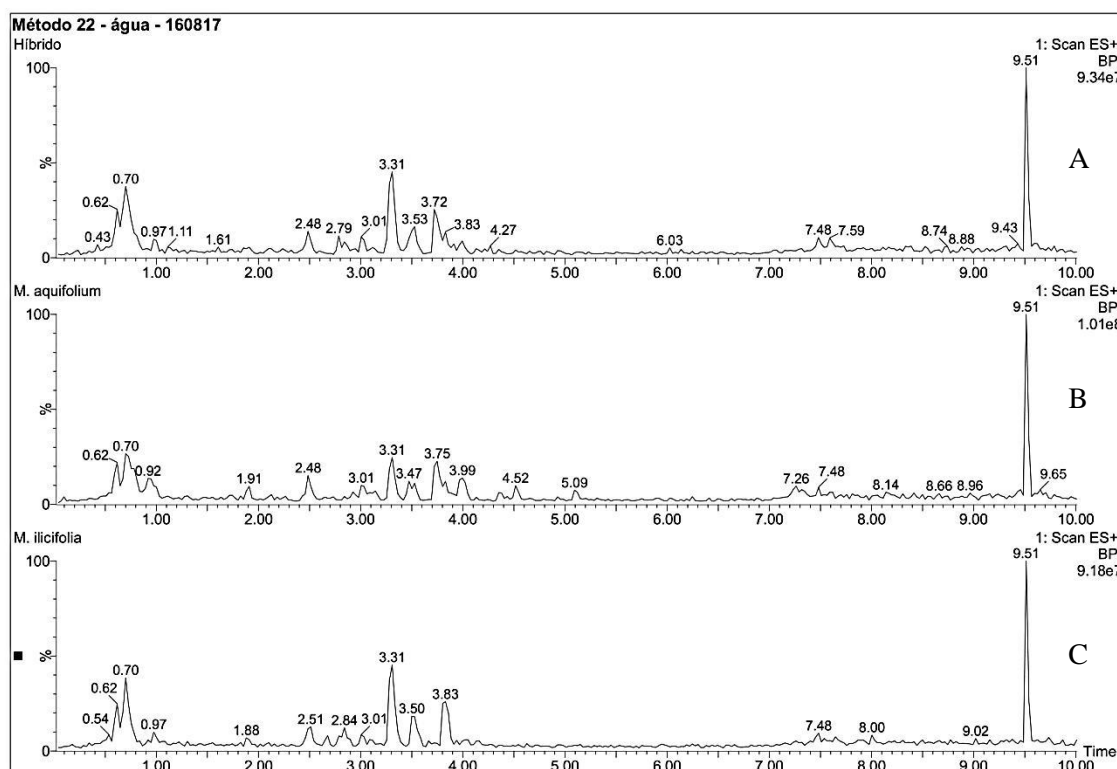


Figura 2. Cromatogramas UHPLC-MS típicos dos extratos e do híbrido (A), *M. aquifolium* (B) e *M. ilicifolia* (C), com ionização em modo positivo (ESI+).

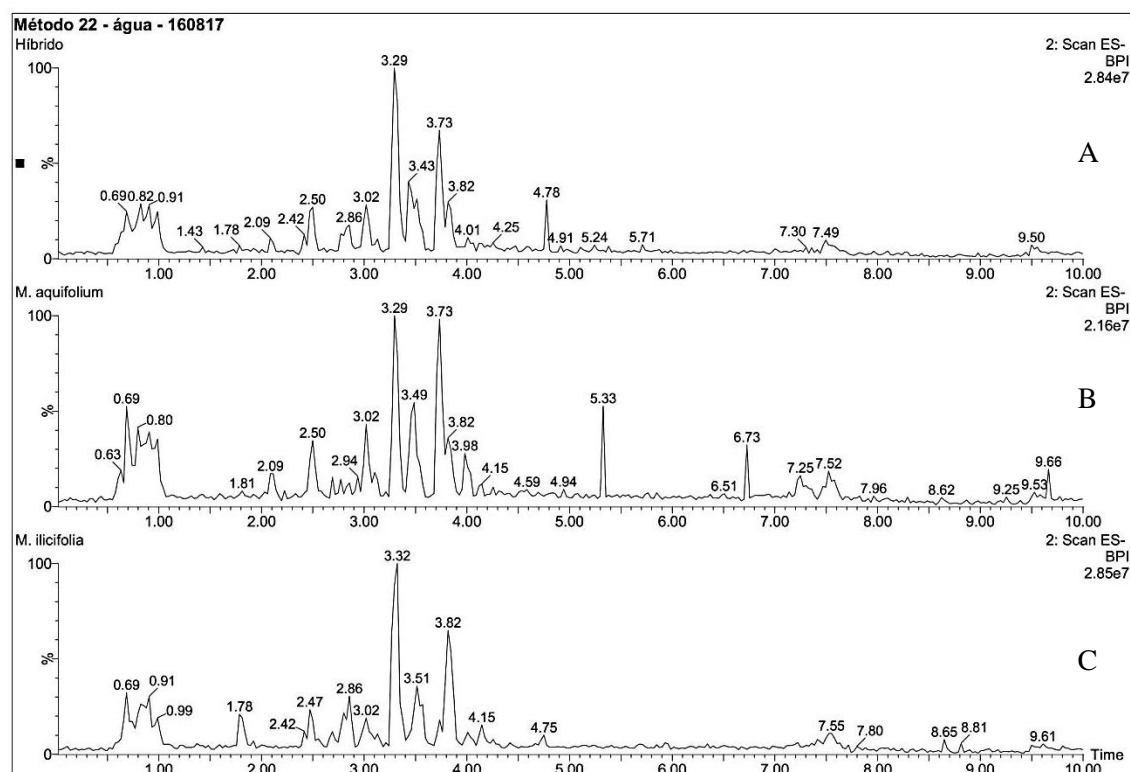


Figura 3. Cromatogramas UHPLC-MS típicos dos extratos e do híbrido (A), *M. aquifolium* (B) e *M. ilicifolia* (C), com ionização em modo negativo (ESI-).

Além das análises dos extratos das plantas coletadas mensalmente, foram preparadas amostras de controle de qualidade (QC), compostas por folhas liofilizadas e trituradas de todos os indivíduos de cada espécie e de todos os meses coletados. As amostras QC foram utilizadas para acompanhar o funcionamento do aparelho de UHPLC-MS e verificar a consistência do mesmo durante as corridas cromatográficas, cuja duração total foi de uma semana. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e as amostras QC foram adicionadas a cada 12 injeções, totalizando 42 amostras de QC.

1.4.4. Análise metabolômica e estatística

Os 402 cromatogramas e espectros obtidos através da análise por UHPLC-MS foram pré-processados através do software XCMS Online no qual foi realizado o alinhamento dos picos, possibilitando detecção de *features* (tempo de retenção e m/z) para cada espécie de Espinheira Santa.

Os parâmetros fornecidos ao software XCMS Online para realização desta etapa estão disponíveis no **Anexo 1**. O software detectou 157 *features*, mas muitos eram redundantes;

eram adutos e /ou fragmentos do mesmo composto. Portanto os resultados foram inspecionados e filtrados de acordo com a relação massa/carga, adutos e tempo de retenção, reduzindo para 24 *features* descritas na Tabela 2.

Tabela 2. *Features* observadas nas análises de LC-MS dos extratos das duas espécies de *Maytenus* e suas híbridas. Rt (tempo de retenção), m/z (relação massa/carga do composto).

<i>Feature</i>	m/z	Rt (min)
M305T2	305	2,449
M625T1	625	1,370
M315T2	315	1,799
M451T2	451	1,895
M461T2	461	2,094
M289T2	289	2,756
M577T3	577	2,978
M369T3	369	3,091
M329T3	329	3,157
M289T3	289	3,253
M917T3	917	3,425
M755T4	755	3,517
M901T4	901	3,697
M739T4	739	3,782
M431T4	431	3,885
M433T4	433	3,956
M833T4	833	4,086
M593T4	593	4,098
M463T4	463	4,181
M725T5	725	4,535

M469T6	469	5,993
M689T7	689	7,228
M703T7	703	7,289
M293T7	293	7,430

Após a detecção das *features*, utilizando valores de intensidade do íon de cada uma, foi possível realizar as Análises de Componentes Principais (PCA), utilizando o software online MetaboAnalyst e os testes estatísticos de ANOVA e Tukey, utilizando o software GraphPad 6.

Através das análises de PCA foi possível observar três agrupamentos bem definidos, que coincidiram com as duas espécies e os híbridos. Apesar de possuírem perfis cromatográficos semelhantes (Figura 3), possuem áreas relativas diferentes para cada *feature*, sendo possível realizar a diferenciação entre elas (Figura 4 e Figura 5).

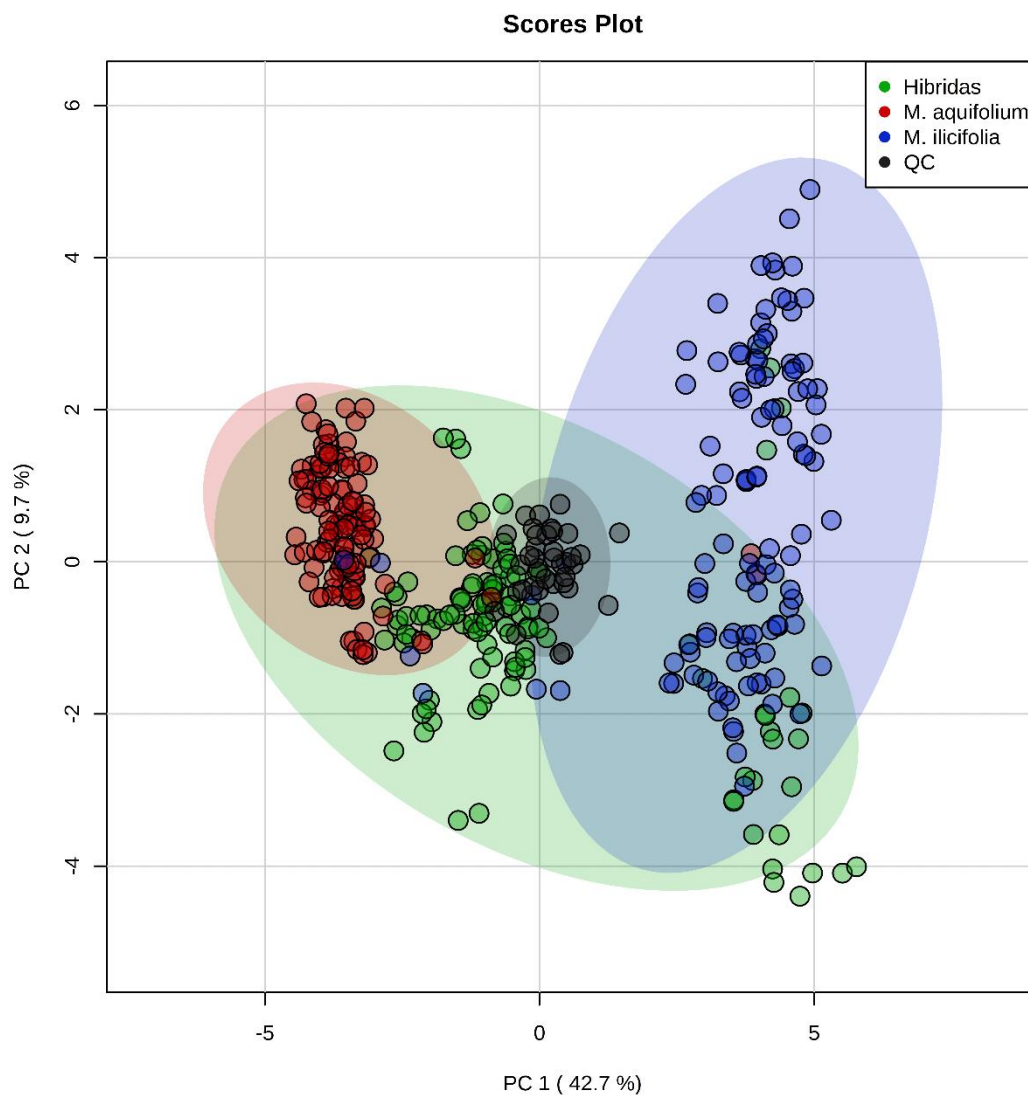


Figura 4. Score Plot de PCA com os agrupamentos das amostras analisadas por UHPLC-MS dos extratos das espécies *M. ilicifolia*, *M. aquifolium*, híbridas e QCs

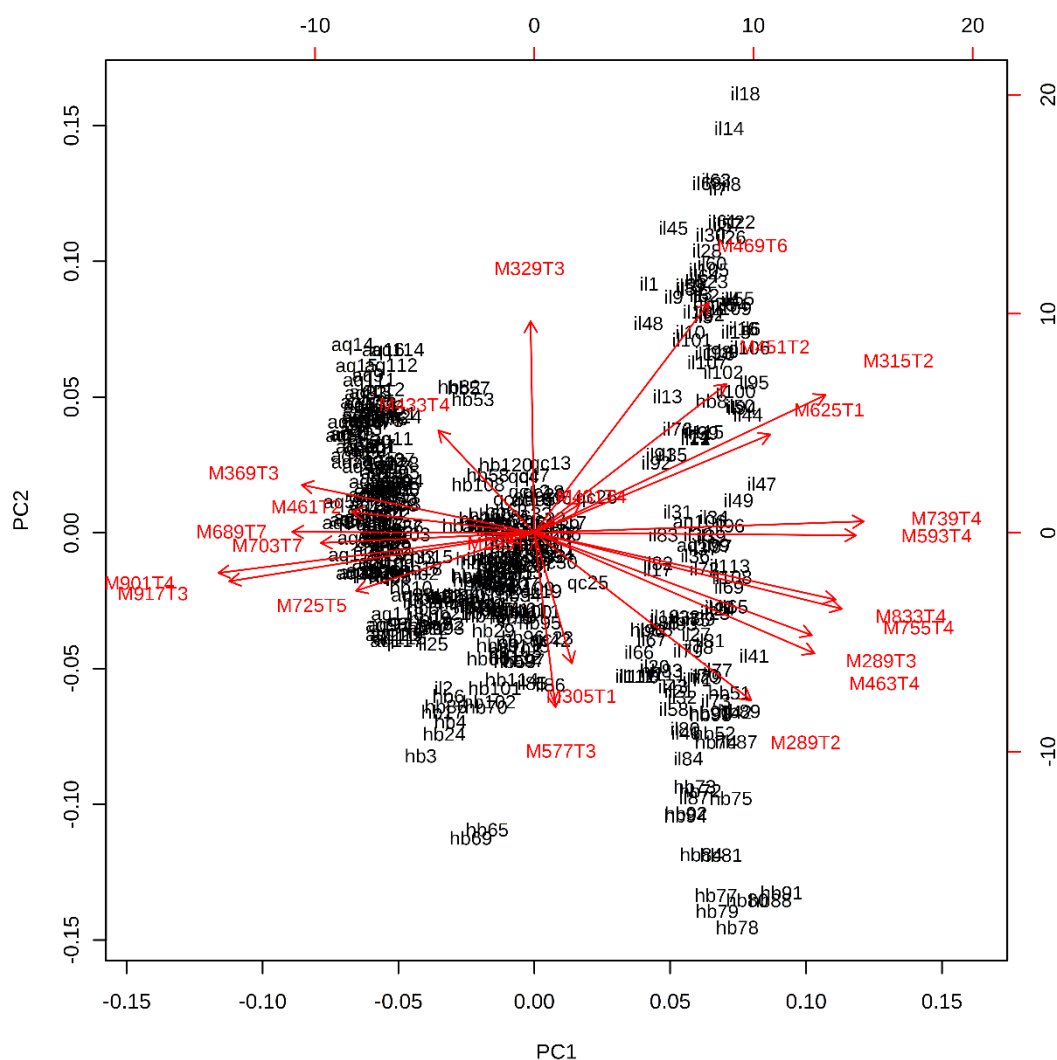


Figura 5. Biplot do PCA indicando as *features* responsáveis pelas separações observadas.

Ao lado esquerdo do Score plot de PCA, como mostra a Figura 4, encontram-se as amostras de *M. aquifolium*, à direita as amostras de *M. ilicifolia* e ao centro, juntamente com as QCs, encontram-se as amostras de plantas híbridas indicando que sua composição química é intermediária entre ambas as espécies. Os agrupamentos observados podem ser explicados por 52,4% da variação da análise de PCA (PC1 + PC2).

Entretanto, como é possível observar, alguns pontos podem ser considerados como outliers em relação aos demais da população híbrida. Tais pontos representam o indivíduo híbrido 4 que mais se assemelha à *M. ilicifolia* (Figura 4).

As diferenças observadas nos gráficos de PCA se devem principalmente a algumas *features* específicas, como demonstrado no Biplot (Figura 5). As *features* de *m/z* 901, 917,

725, 703, 689, 369, 461 e 433 foram responsáveis pela diferenciação das amostras de *M. aquifolium* em relação às demais. Em contrapartida, as *features* de m/z 469, 451, 315, 625, 739, 593, 833, 755 e 289 foram responsáveis pela separação das amostras de *M. ilicifolia* (Figura 5).

Além disso, através da PCA foi demonstrada a qualidade e reprodutibilidade no preparo e extração das amostras além da consistência do equipamento de UHPLC-MS durante as análises, uma vez que as amostras de QC se mostraram bem agrupadas ao centro do gráfico de PCA (Figura 4).

Para confirmar os resultados obtidos pelas análises de PCA, em especial com relação às diferenças entre as espécies e as *features* responsáveis pelas separações observadas, foram realizadas análises estatísticas de ANOVA e teste Tukey e foram plotados gráficos com média e desvio padrão das intensidades de cada *feature*, por espécie (Figura 6 e Figura 7).

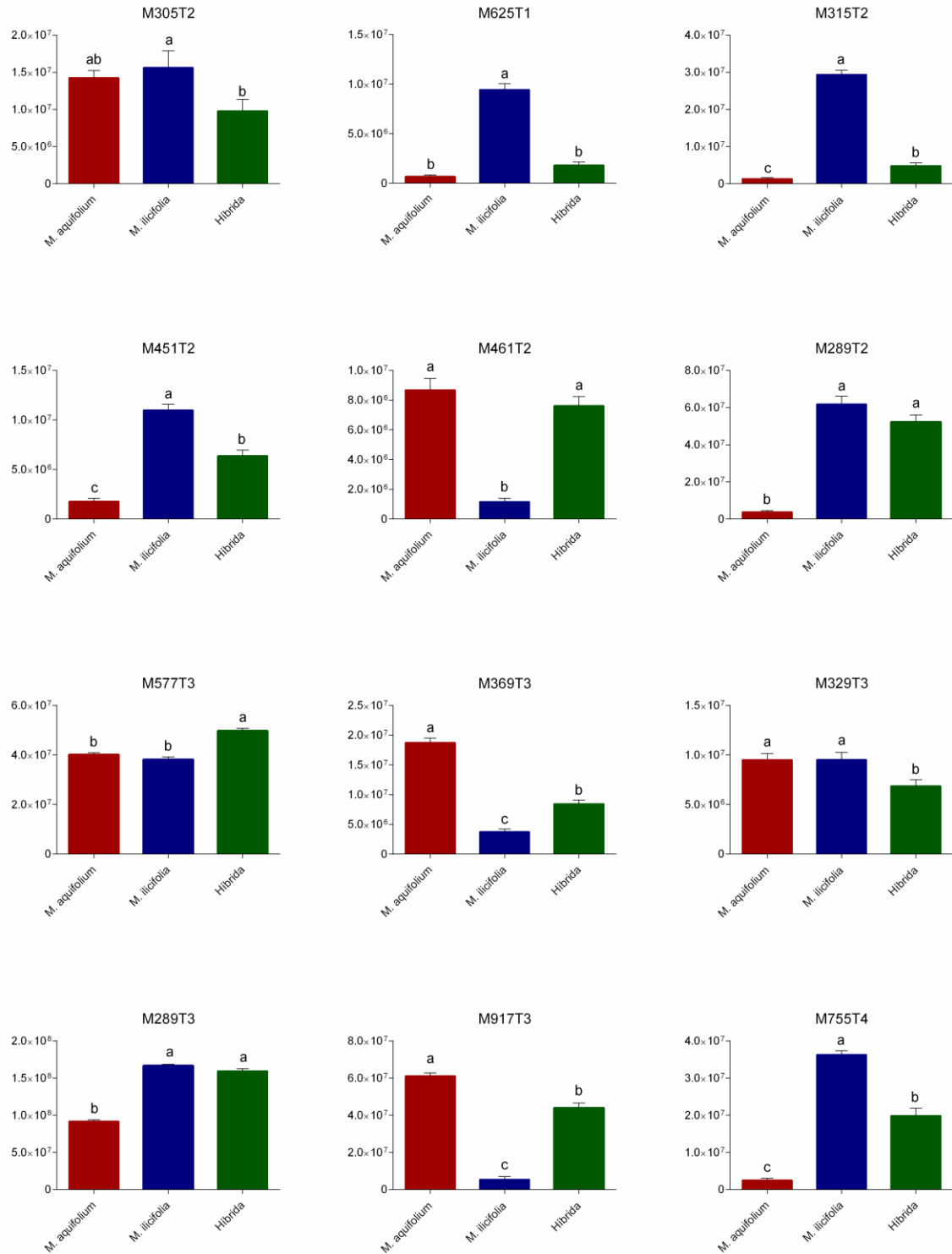


Figura 6. Intensidades médias de cada *feature* por cada as duas espécies de Espinheira Santa e seu híbrido. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão (n=120) ($p \leq 0,05$).

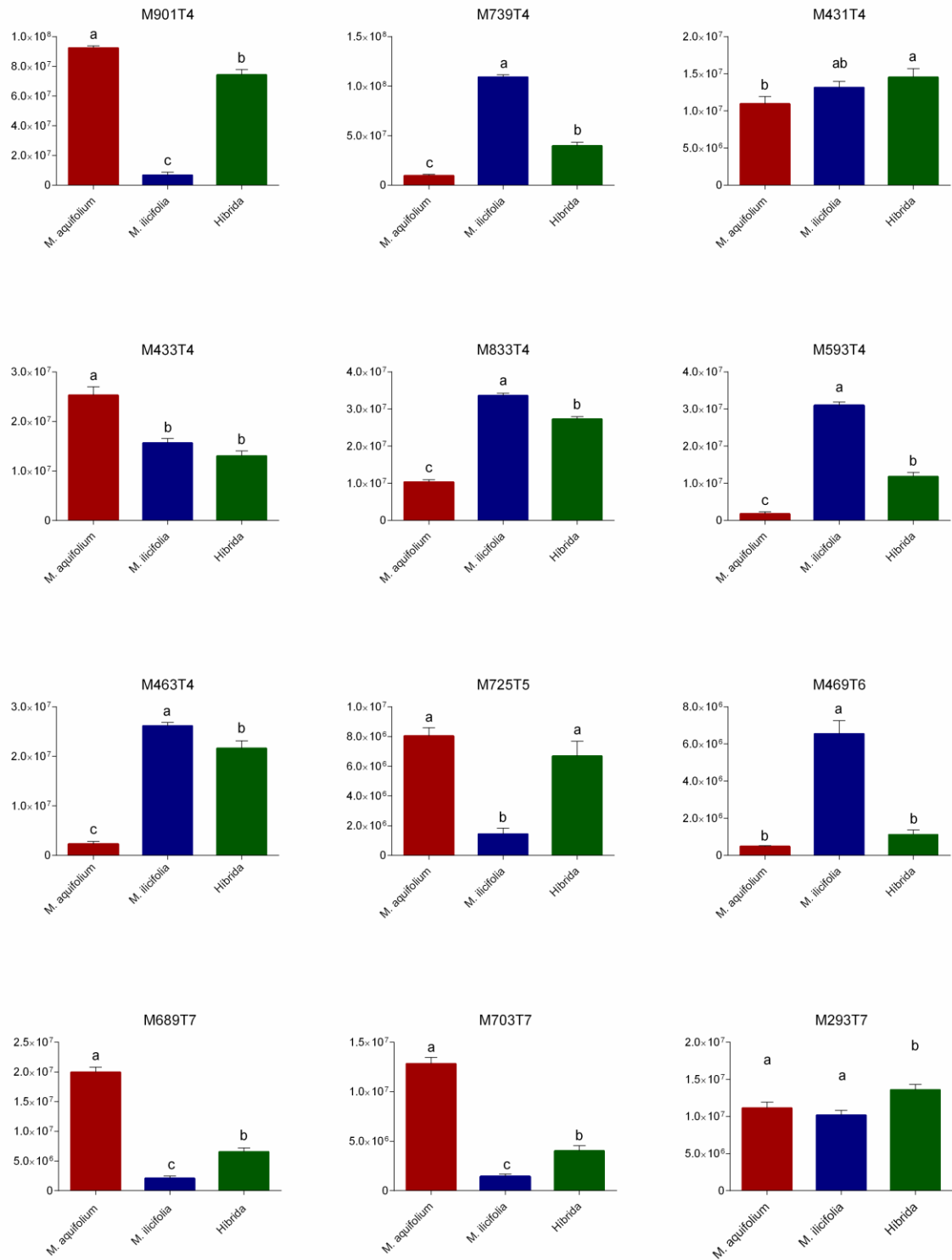


Figura 7. Intensidades médias de cada *feature* por cada as duas espécies de Espinheira Santa e seu híbrido. Letras diferentes dentro do mesmo gráfico indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão (n=120) ($p \leq 0,05$).

As *features* mais intensas em *M. ilicifolia* foram: M625T1, M315T2, M451T2, M755T4, M739T4, M833T4, M593T4, M463T4, M469T4 podendo ser considerados marcadores desta espécie. Por outro lado os *features* mais intensos em *M. aquifolium* foram: M369T3, M917T3, M9014, M433T4, M689T7, M703T7, podendo ser considerados marcadores desta espécie.

Os indivíduos híbridos apresentaram áreas intermediárias entre as duas espécies para a maioria das *features*. Para algumas, porém, a área era equivalente à uma das espécies parentais e somente para as *features* M577T3 e M293T7 foi observada uma maior abundância. Este comportamento possivelmente é decorrente da mistura entre genótipos presentes nos híbridos.

Foi observado, portanto, que todas as 24 *features* demonstraram diferença significativa por ANOVA, com valor de $p \leq 0,05$ quando analisadas e comparadas por espécie, sendo responsáveis pela separação observada no score plot de PCA. Entretanto, por tais análises não foram observados agrupamentos indicando variação sazonal, desta forma, foi realizada análise de PCA com cada espécie separadamente e ANOVA com suas respectivas *features*.

1.4.5. Análise metabolômica e estatística das amostras por espécie

Ao analisar cada espécie separadamente, nas PCA realizadas por espécie também não foi possível observar agrupamentos indicando variação sazonal, o que demonstra que as diferenças entre espécies foram maiores que a sazonalidade, reforçando a importância da identificação taxonômica, independente da época do ano (Figura 8, Figura 9 e Figura 10).

Entretanto, durante o período de coleta, os indivíduos das espécies *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* estavam sob constante estresse devido à plantas parasitas. No mês de Setembro, porém, foi realizada poda e limpeza do campo experimental no qual tais espécies se encontravam. Desta forma, alguns dos indivíduos de *M. ilicifolia*, selecionados para a coleta sofreram poda acidental e através da PCA é possível perceber um agrupamento destes indivíduos para os meses de Setembro e Outubro (Figura 8).

Além disso, com relação aos indivíduos híbridos, é possível observar um agrupamento à direita do score plot de PCA, formado pelo indivíduo morfologicamente semelhante à espécie *M. ilicifolia* (indivíduo 4). Tal indivíduo apresenta porte e folhas menores e ramificações desde a base, diferentemente dos demais indivíduos da população híbrida, que à

semelhança da espécie *M. aquifolium*, apresentam porte e folhas maiores e um tronco central, não ramificado. Através da PCA é possível perceber que as diferenças químicas refletiram as diferenças morfológicas, separando os demais indivíduos daquele semelhante à *M. ilicifolia* (Figura 10).

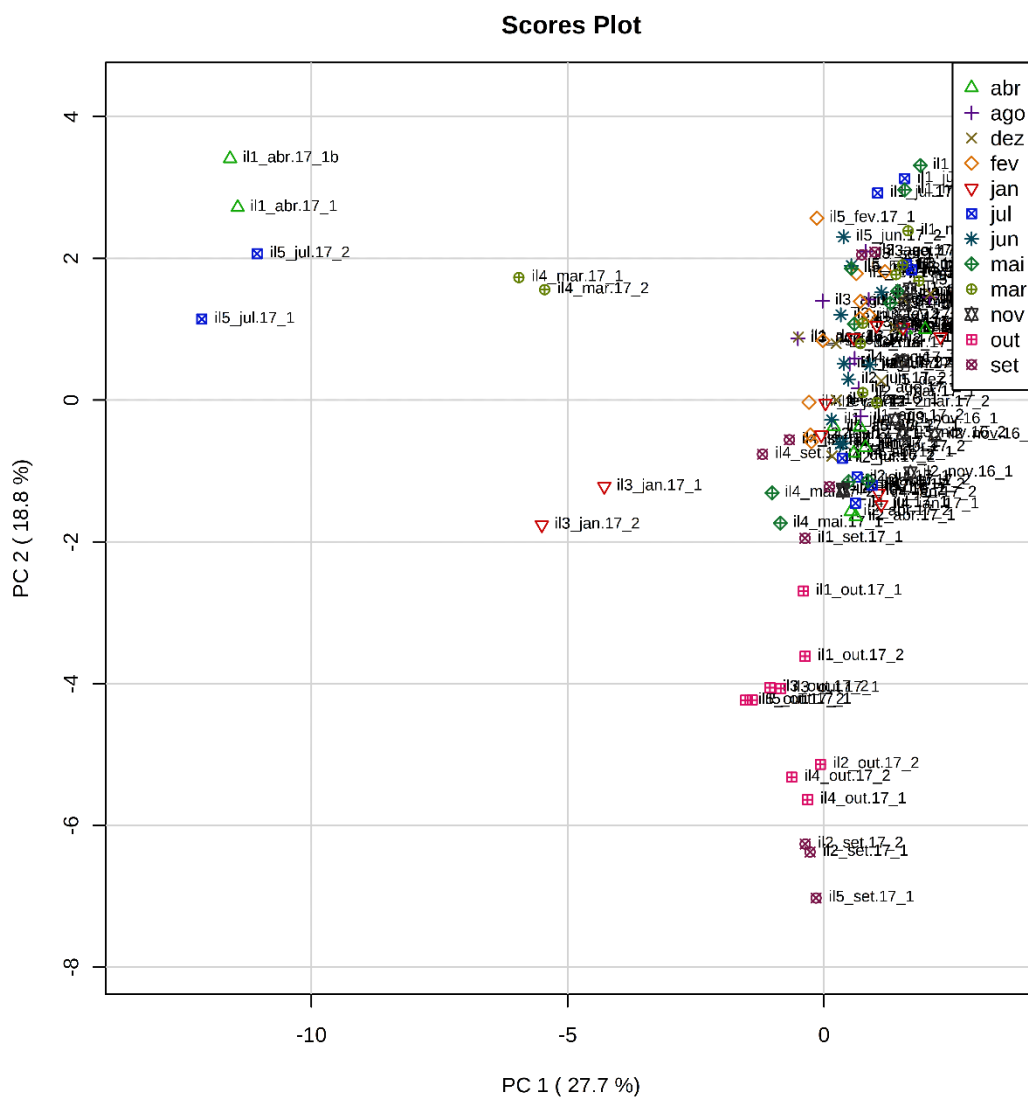


Figura 8. PCA com amostras analisadas por UHPLC-MS dos extratos da espécies *M. ilicifolia*.

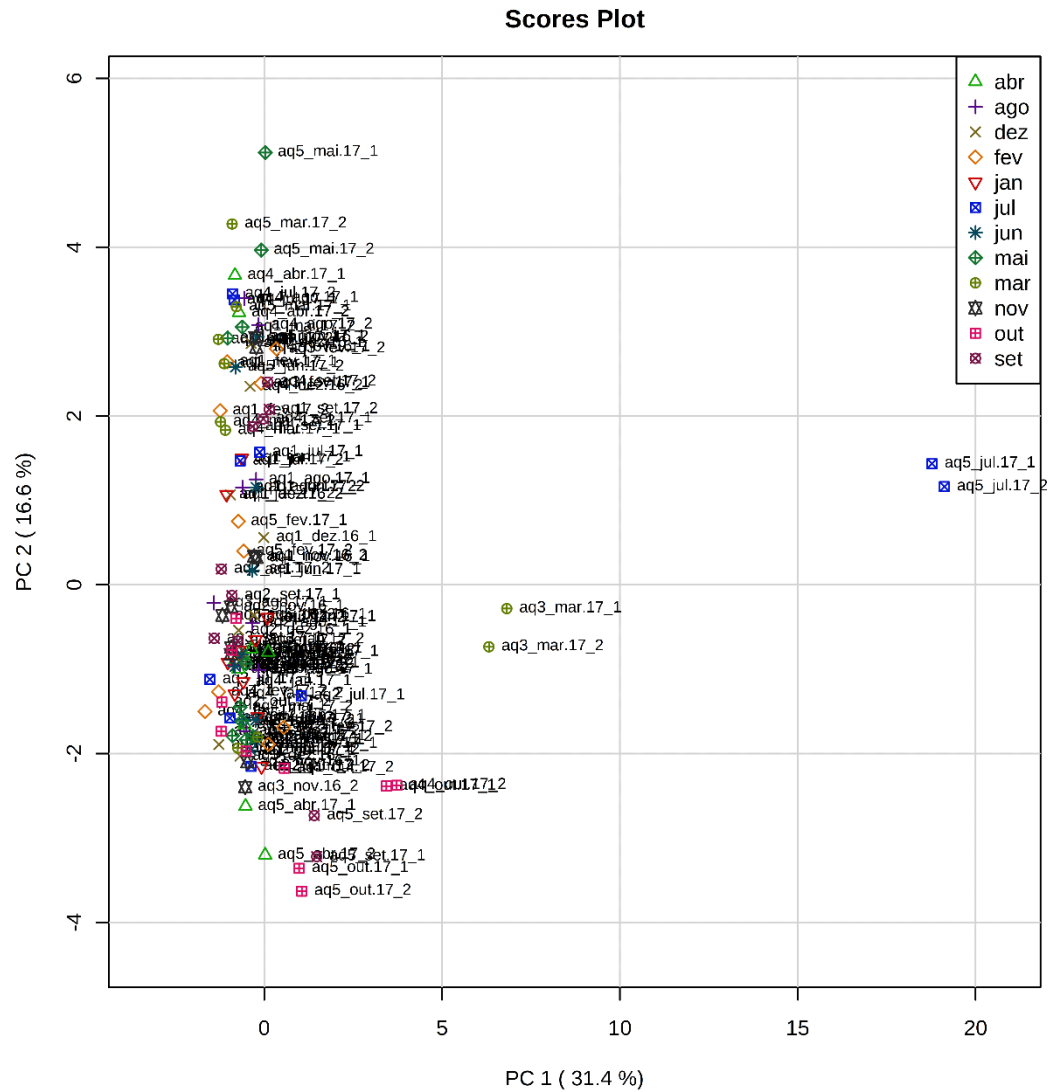


Figura 9. PCA com amostras analisadas por UHPLC-MS dos extratos da espécie *M. aquifolium*. Biplot em **Anexo 3**

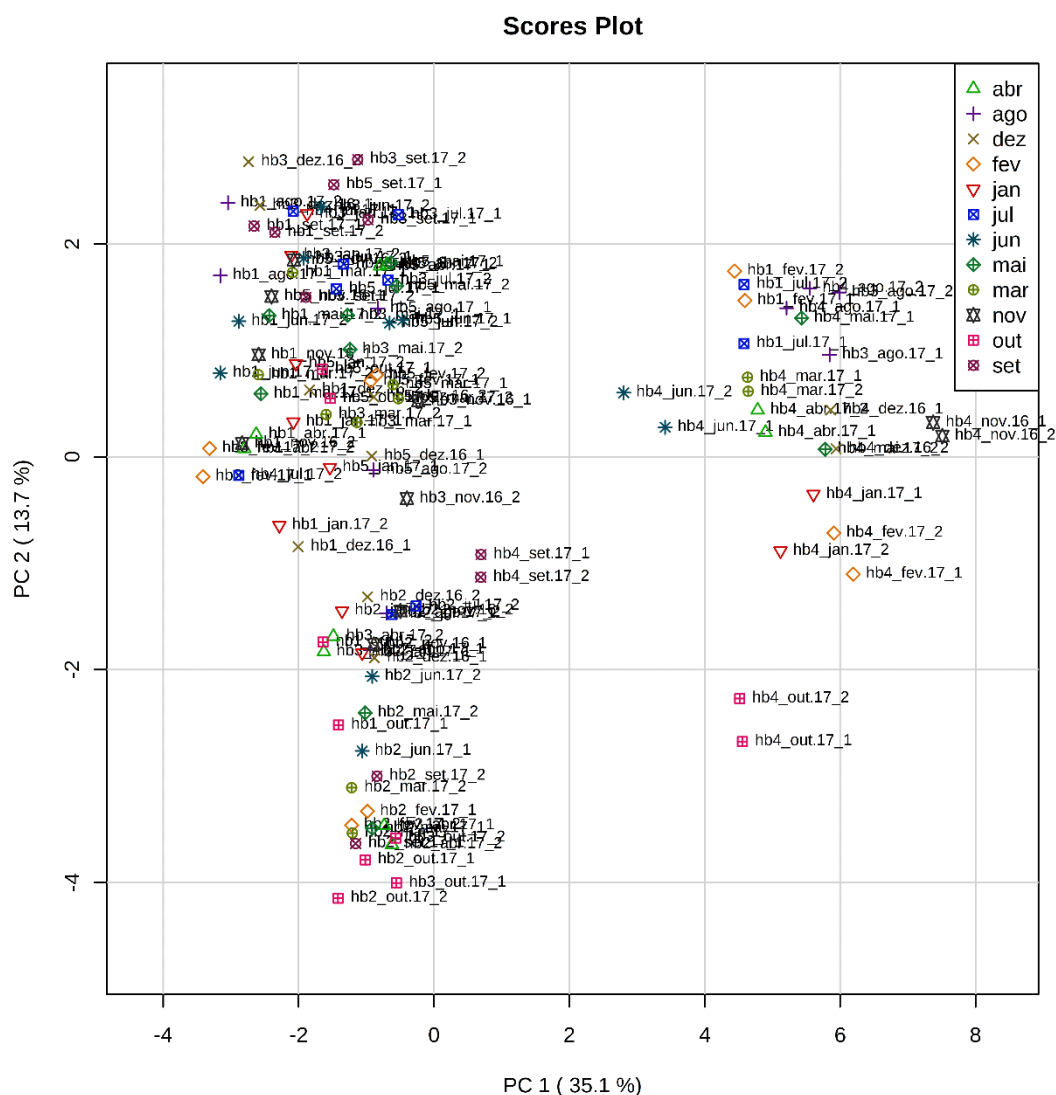
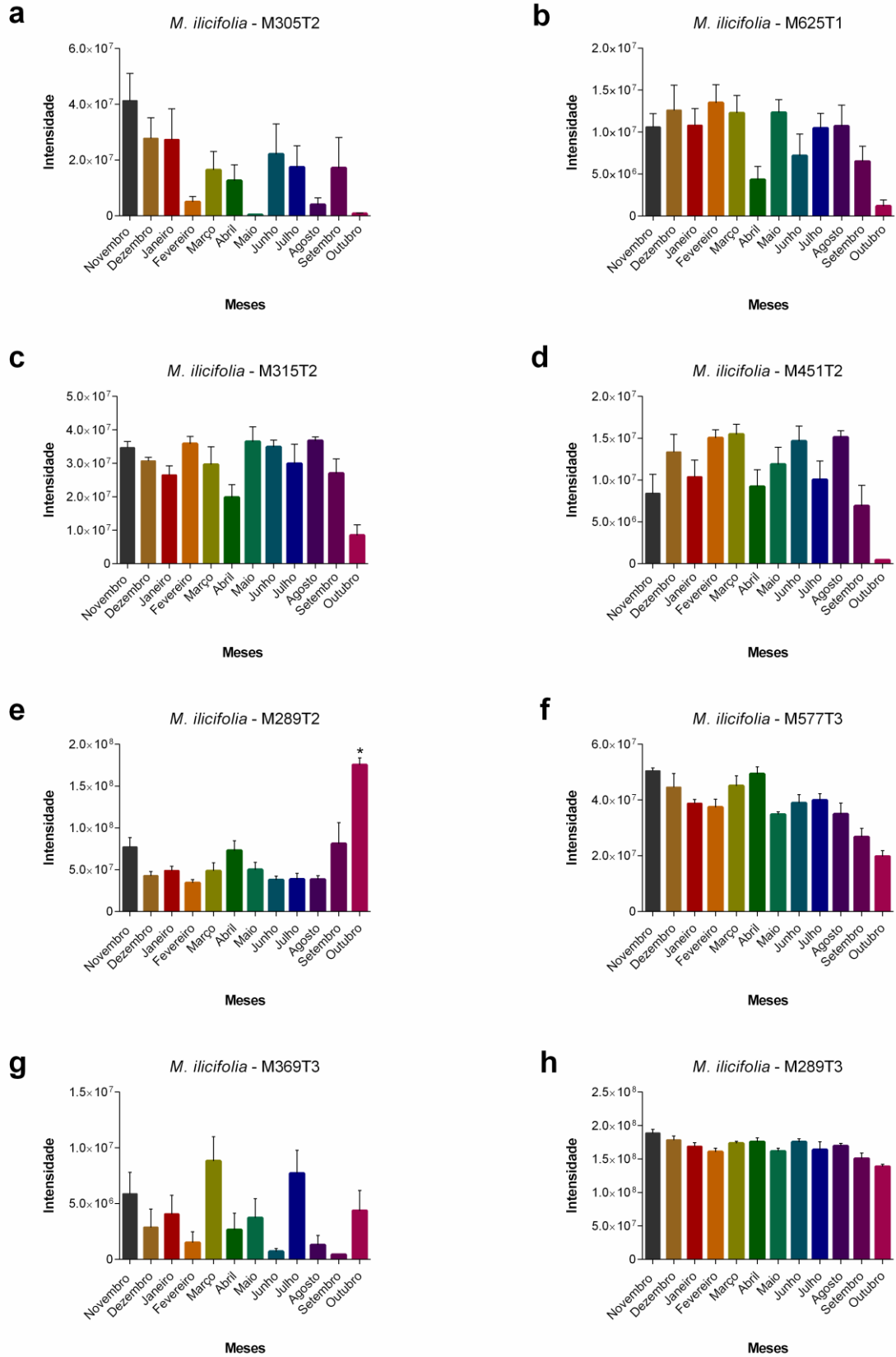


Figura 10. PCA com amostras analisadas por UHPLC-MS dos extratos dos indivíduos híbridos. Biplot em **Anexo 4**.

Porém, ao comparar a variação de cada feature por mês, dentro de cada espécie, 16 *features* mostraram diferenças estatisticamente significativas dentre as amostras de *M. ilicifolia*, 8 *features* nas amostras de *M. aquifolium* e 5 *features* nas amostras dos indivíduos Híbridos, todas com $p < 0,05$ (Figura 11 à Figura 13)



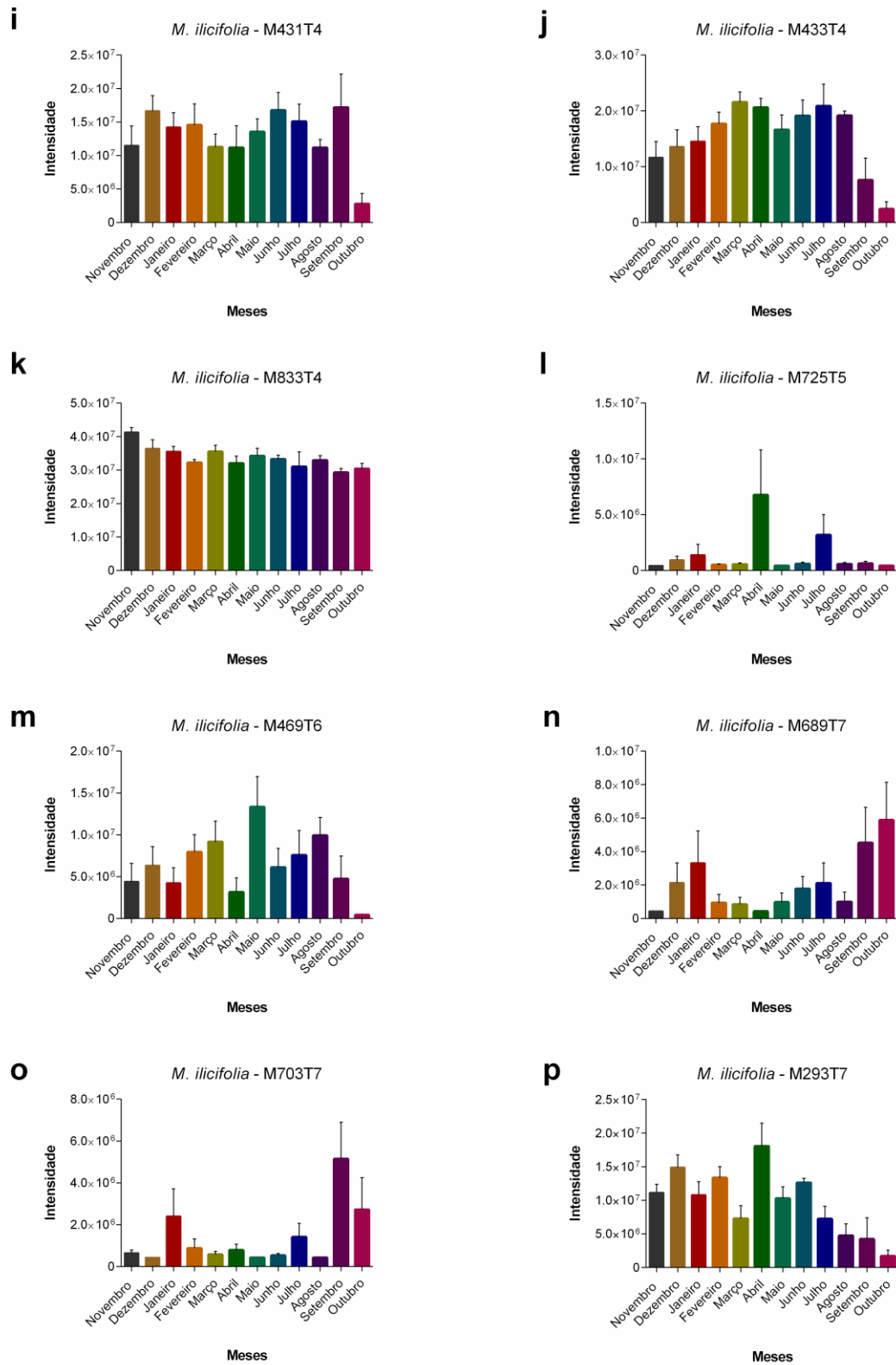


Figura 11. Variação de intensidade média e erro padrão das *features* válidas por mês nos indivíduos da espécie *M. ilicifolia*. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão (n=10) ($p \leq 0,05$).

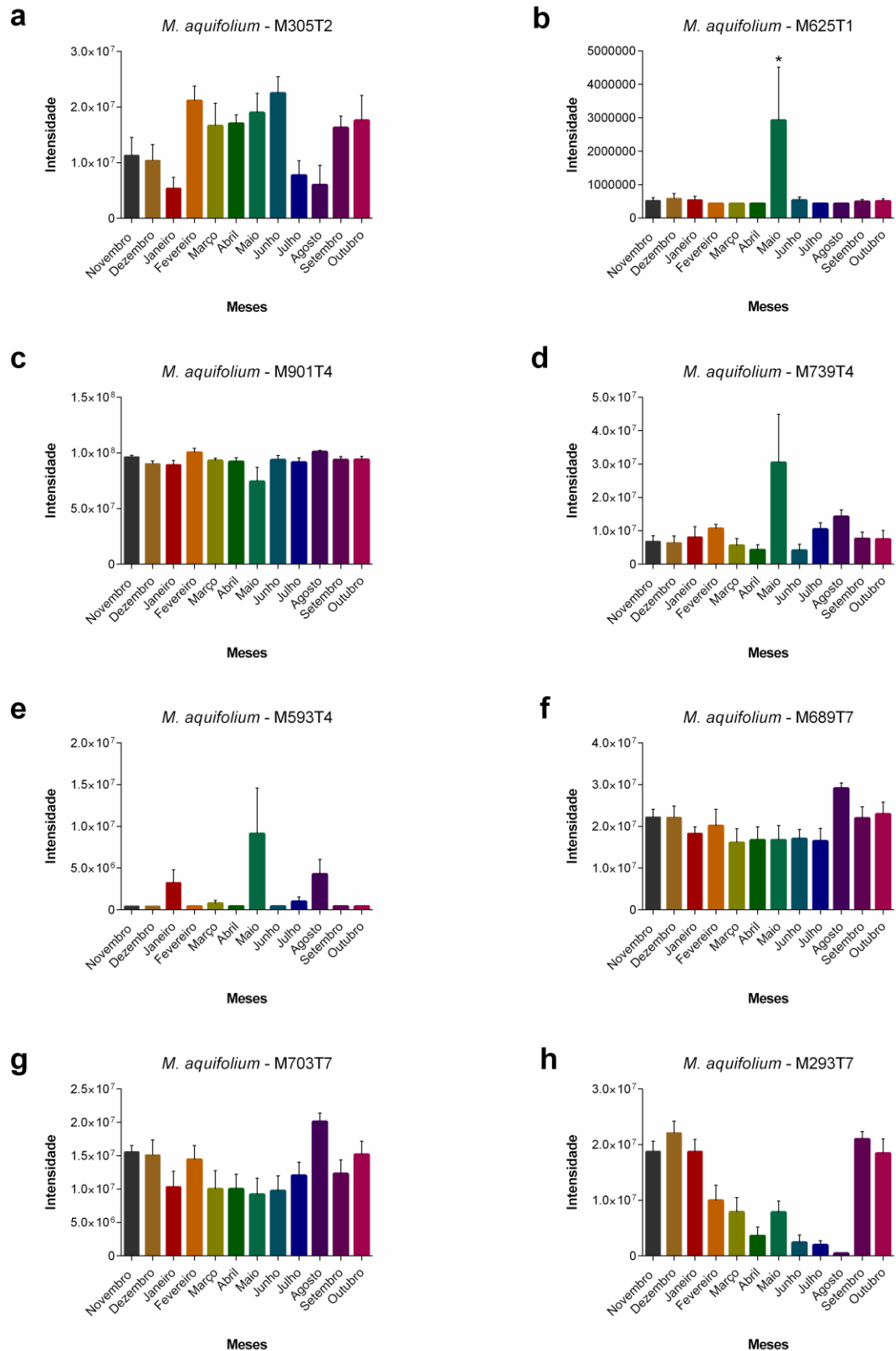


Figura 12. Variação de intensidade média e erro padrão das *features* válidas com valor $p \leq 0,05$ por mês nos indivíduos da espécie *M. aquifolium*. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão (n=10). ($p \leq 0,05$).

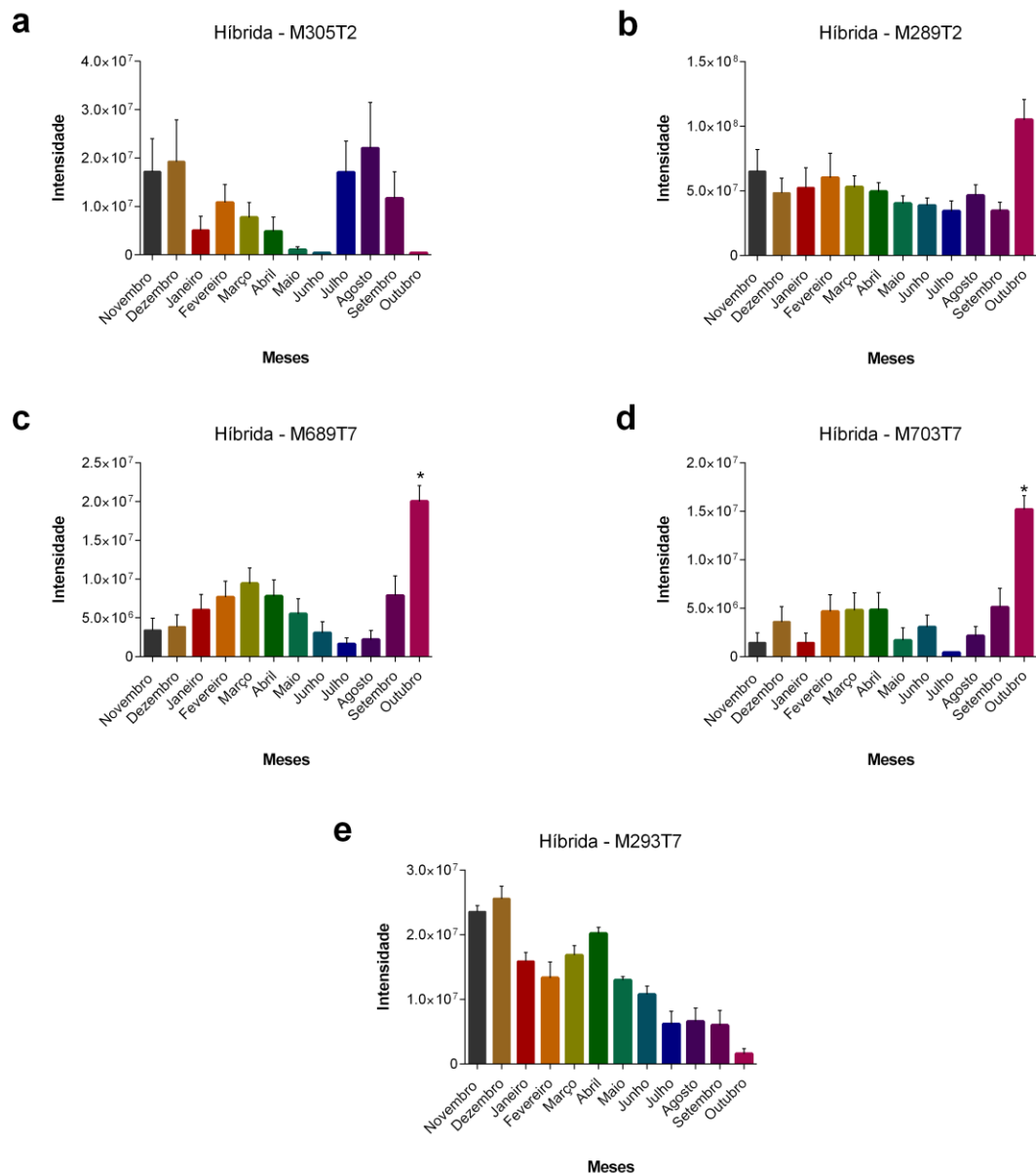


Figura 13. Variação de intensidade média e erro padrão das *features* válidas com valor $p \leq 0,05$ por mês nos indivíduos Híbridos. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão ($n=10$). ($p \leq 0,05$).

Para tais *features*, foi possível observar diferenças nas intensidades de cada uma, mês a mês. Para os indivíduos de *M. ilicifolia*, em relação à todos os outros meses, houve variação mensal significativa para a *feature* M289T2, cuja intensidade foi maior no mês de outubro (Figura 11e).

Para confirmar tal resultado, foi realizado o teste Tukey para a *feature* M289T2, mês a mês, por indivíduo, para verificar se a poda acidental, que afetou somente dois indivíduos, foi de fato responsável pelo resultado observado em *M. ilicifolia*. Nota-se, a partir da observação

dos gráficos, o aumento da *feature* M289T2 nos indivíduos podados já em Setembro e se mantendo alta no mês seguinte. Porém, em outubro, os demais indivíduos de *M. ilicifolia* também apresentaram aumento significativo (Figura 14).

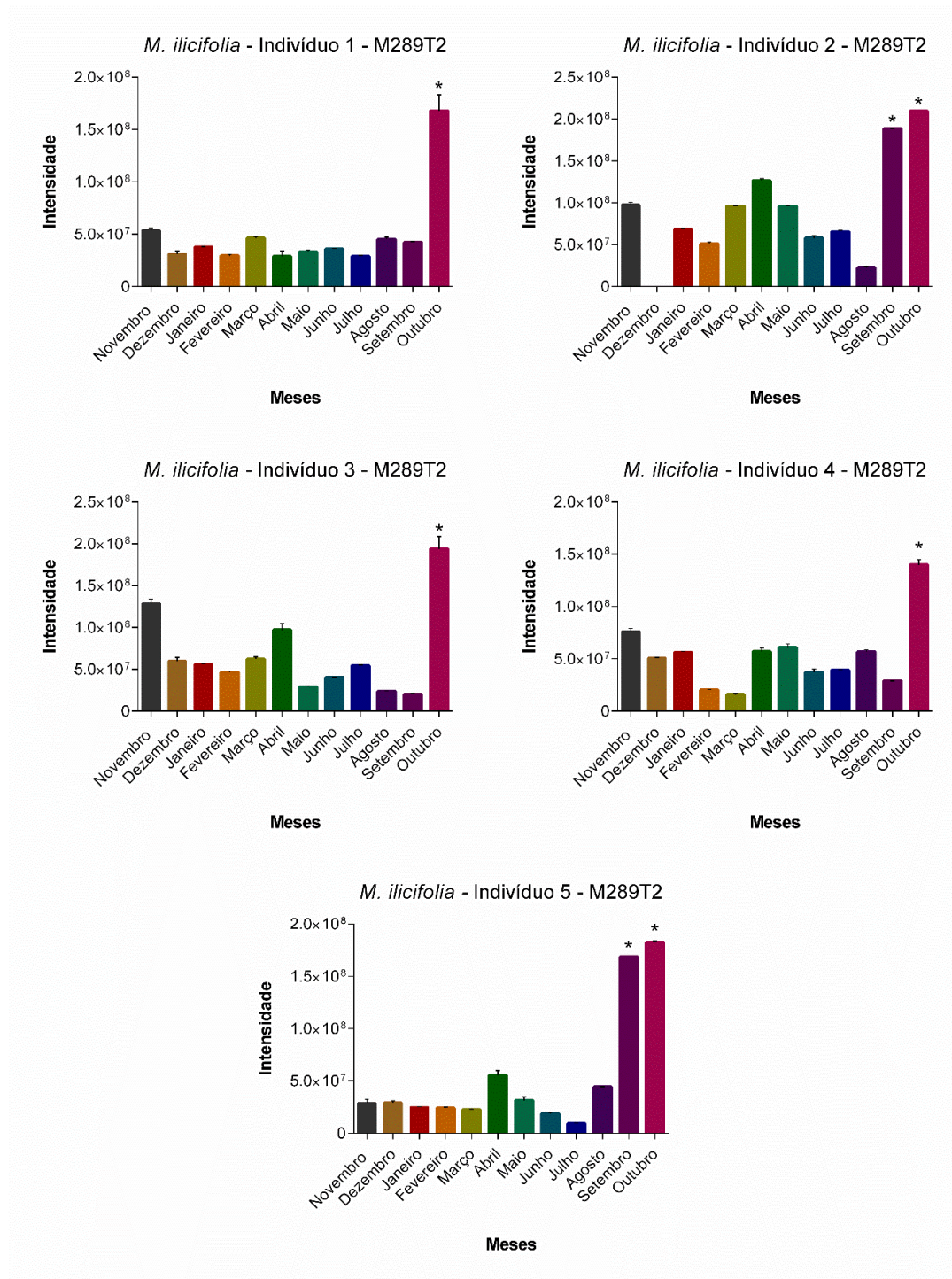


Figura 14. Variação de intensidade da *feature* M289T2, mês a mês nos cinco indivíduos de *M. ilicifolia*. Os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão (n=2) ($p \leq 0,05$).

Para os indivíduos de *M. aquifolium* em relação a todos os outros meses, houve variação mensal significativa para a *feature* M625T1, cuja intensidade foi maior no mês de maio (Figura 12b). Para os indivíduos híbridos, as *features* M689T7 e M703T7 também apresentaram maior intensidade no mês de outubro que nos outros meses (Figura 13c, d). As demais *features* apresentaram variabilidade mensal, porém sem diferenças estatisticamente significativas.

1.4.6. Identificação de *features*

Com a finalidade de compreender a relação entre as mudanças de intensidade observadas, foi realizada revisão bibliográfica a fim de obter propostas de identificações das *features* observadas neste trabalho. Foi verificado que algumas das *features* detectadas no presente estudo também foram observadas por outros autores, como no caso das análises realizadas por Tiberti *et al.*, (2007) ²⁰ no qual foram detectados as *m/z* 917, 901, 755, 463, 593 e 725, nos extratos de folhas de *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e dos indivíduos híbridos.

Tais *features* foram identificadas como sendo flavonóides e foram detectadas nas mesmas espécies, com a *m/z* 725 presente em maior quantidade na *M. aquifolium* e na híbrida e a *m/z* 593 sendo mais abundante em *M. ilicifolia* ²⁰. Além disto, neste mesmo estudo, o íon de *m/z* 463 foi detectado em dois tempos de retenção diferentes (12,0 e 12,4 minutos) e foi identificado como Hiperosídio e Isoquercitrina respectivamente. É possível que este mesmo íon, encontrado no presente trabalho no tempo de retenção 4,18 minutos, seja um destes compostos, embora não foi possível sua identificação por comparação com padrão.

Em estudo realizado por Souza *et al.* (2008) ⁶³, também foram detectadas, nos extratos de *M. ilicifolia*, algumas *features* com o mesmo valor de *m/z*: 289, 463, 577, 593 e 833, identificados como pertencentes aos grupos dos taninos e flavonóides ⁶⁴. Em outro estudo, Souza *et al.* (2009) também obtiveram os seguintes íons detectados em análises dos extratos de *M. ilicifolia*: *m/z* 917, 901, 755, 739, 625, 433, 593, 463 e 433, identificados como pertencentes à família dos flavonóides glicosilados.

Baggio *et al.* (2009) ⁶⁵, através do uso de HPLC-MS, também detectaram e identificaram parcialmente, em extratos de *M. ilicifolia*, os *m/z* 289 (catequina e epicatequina), 463 e 433 (flavonoides monoglicosilados), 593 (flavonoide diglicosilados), 755 e 739 (flavonoide triglicosilado), 917 e 901 (flavonoides tetraglicosilados) e 833 e 577 (taninos), corroborando com os estudos citados anteriormente.

Em estudo realizado por Fonseca *et al.* (2007) ⁶⁶, mesmo em análise de extrato de folhas de outra espécie deste gênero (*M. truncata*), foram detectados dois íons com os m/z 901 e 917 também encontrados no presente trabalho. Através do uso de espectrometria de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (NMR), os autores identificaram o íon 901 como Canferol-3-*O*-ramnopiranosil-*O*-glicopiranosil-*O*-ramnopiranosil-*O*-galactopiranosídeo e o íon 917 como Quercetina-3-*O*-ramnopiranosil-*O*-glicopiranosil-*O*-ramno-piranosil-*O*- galactopiranosídeo, ambos flavonoides glicosilados.

As amostras de *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e dos indivíduos Híbridos foram também analisadas em equipamento de alta resolução. Tal análise forneceu valores de m/z mais precisos para algumas das *features* detectadas e através do uso da ferramenta de pesquisa “Elemental Composition” (EleComp) do software MassLynx v.4.1, foi possível obter a fórmula química proposta para 13 *features*.

Assim, com a fórmula química obtida, com base na massa de alta resolução, no programa MassLynx, juntamente com os dados da literatura citados anteriormente e as propostas de indentificação da literatura em espécies do gênero *Maytenus*, também foi possível propor identificações para os íons detectados no presente trabalho (**Tabela 3**).

Tabela 3. Valores de massa de alta resolução, identificações propostas e referências das *features* detectadas em extratos de folhas de Espinheira Santa. Afz→afzelequina ou epiafzelequina; Cat→catequina ou epicatequina; Gall→galocatequina or epigalocatequina; Rha→rhamnose; Ara→arabinose; Kaemp→kaempferol; Hex→glucose ou galactose.

<i>feature</i>	Massa alta resolução	EleComp	Proposta de identificação	Ref.
M305T2	-	-	fragmento principal de m/z 577	64
M625T1	-	-	Hex-Hex-Quer	65
M315T2	-	-	-	-
M451T2	-	-	-	-
M461T2	-	-	-	-
M289T2	290.079	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catequina	
M577T3	578.142	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Afz-Gall / Cat-Cat	64

M369T3	-	-	-	-
M329T3	330.099	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	-	-
M289T3	290.079	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Epicatequina	
M917T3	918.264	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₅	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosil- <i>O</i> - glicopiranosil- <i>O</i> -ramno-piranosil- <i>O</i> - galactopiranosídeo	66
M755T4	756.211	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	Rha-Rha-Hex-Quer	65
M901T4	902.269	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₄	Canferol-3- <i>O</i> -ramnopiranosil- <i>O</i> - glicopiranosil- <i>O</i> -ramnopiranosil- <i>O</i> - galactopiranosídeo	66
M739T4	740.217	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	Rha-Rha-Hex-Kaemp	65
M431T4	-	-	-	-
M433T4	434.215	C ₂₀ H ₃₄ O ₁₀	Ara-Quer	65
M833T4	834.215	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₆	Afz–Afz–Cat	65
M593T4	594.158	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol-deoxihexosil-hexosidio / Quercetina-deoxihexosil-deoxihexosidio / Quercetina-deoxihexosil-hexosidio / Rha- Hex-Kaemp	64,65
M463T4	464.095	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Hex-Quer / Quercetin-hexoside / Hiperosídeo / Isoquercitina	20,64,65
M725T5	-	-	-	-
M469T6	-	-	-	-
M689T7	690.326	C ₃₆ H ₅₀ O ₁₃	-	-
M703T7	704.341	C ₃₇ H ₅₂ O ₁₃	-	-

M293T7	294.183	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	-	-
--------	---------	--	---	---

De todas as 24 *features* detectadas, somente 11 foram identificadas parcialmente e duas foram confirmadas por comparação com padrão analítico. As *features* M289T2 e M289T3 foram identificadas respectivamente como catequina e epicatequina.

Assim, é provável que a poda accidental tenha causado, nos indivíduos 2 e 5, um aumento na intensidade da catequina (M289T2), composto pertencente ao grupo químico dos polifenóis que, por sua vez, estão relacionados à resposta ao estresse por dano físico²⁹⁻³³.

De acordo com a revisão de Baron *et al.* (1995)²⁹, em alguns estudos foi verificado que a resposta das plantas à injúria inclui a indução de genes cuja finalidade é reforçar a parede de células danificadas. Além disso, a resposta à injúria pode também promover a defesa contra ataques de herbívoros, através da produção de fitoalexinas, síntese de inibidores de proteinases ou acúmulo de compostos fenólicos.

Edwards *et al.* (1983)³⁰ afirmam que a resposta à injúria possui três níveis, dependendo da espécie vegetal afetada ou dos processos químicos envolvidos: (1) a resposta pode ser localizada e mudanças químicas ocorrem como consequência do rompimento das células; (2) as modificações químicas ocorrem aos arredores da área afetada, nos quais os níveis das substâncias sintetizadas em resposta à injúria são altas; (3) as respostas são mais dispersas e podem afetar o órgão todo, partes da planta ou até mesmo todo o indivíduo.

Uma das repostas mais conhecidas associadas à injúria é o aumento dos níveis de compostos fenólicos nos arredores das células danificadas. As substâncias mais comuns formadas em resposta aos danos são ácido clorogênico e isoclorogênico, além de ácido p-coumarico, ácido cafeico e escopoletina³⁰. Sun *et al.* (2018), por exemplo, verificaram, através de análises por HPLC das folhas de árvores de *Camelia sinensis*, o acúmulo de epigallocatequina galato em folhas dos indivíduos submetidos à poda e a diminuição dos níveis de de cafeína e epicatequina nestes mesmos indivíduos³¹.

Karban *et al.* (1989), em revisão, também apresentam inúmeros trabalhos em que foi observado que uma das respostas à injúria é o aumento dos níveis de taninos e compostos fenólicos nas folhas das plantas afetadas, além da produção de etileno que por sua vez, influencia na concentração de compostos secundários³². Corroborando com tais estudos, Wun

Ke *et al.* (2018) observaram que os níveis de epigallocatequina e epicatequina, antocianinas, flavonóides e polifenóis totais foram maiores após exposição plantas de *C. sinensis* ao precursor de etileno, indicando que a sinalização por tal fitohormônio está envolvida na acumulação de compostos secundários e sua atividade antioxidante ³³.

Apesar de tais artigos tratarem principalmente de injúria causada por herbívoros, a poda accidental ocorrida em setembro pode ter mimetizado uma condição semelhante, ainda que extrema, levando à respostas das plantas comumente direcionadas à herbivoria. Alguns trabalhos relataram que a injúria artificial causada pela poda das plantas gera respostas semelhantes às obtidas após injúria por herbivoria, sendo tal resposta o aumento de compostos fenólicos nas plantas estudadas ^{32,67}.

Por outro lado, o aumento na intensidade da *feature* M289T2 (catequina) nos indivíduos que não sofreram poda accidental pode estar relacionado a mudanças climáticas no mês de outubro (Figura 15), no qual se observou queda na temperatura e radiação incidente média ^{68,69}, ou à sinalização química relacionada à injúria sofrida pelos outros indivíduos no campo experimental, capaz de induzir o acúmulo de compostos fenólicos nos indivíduos que não sofreram a poda ⁷⁰⁻⁷³.

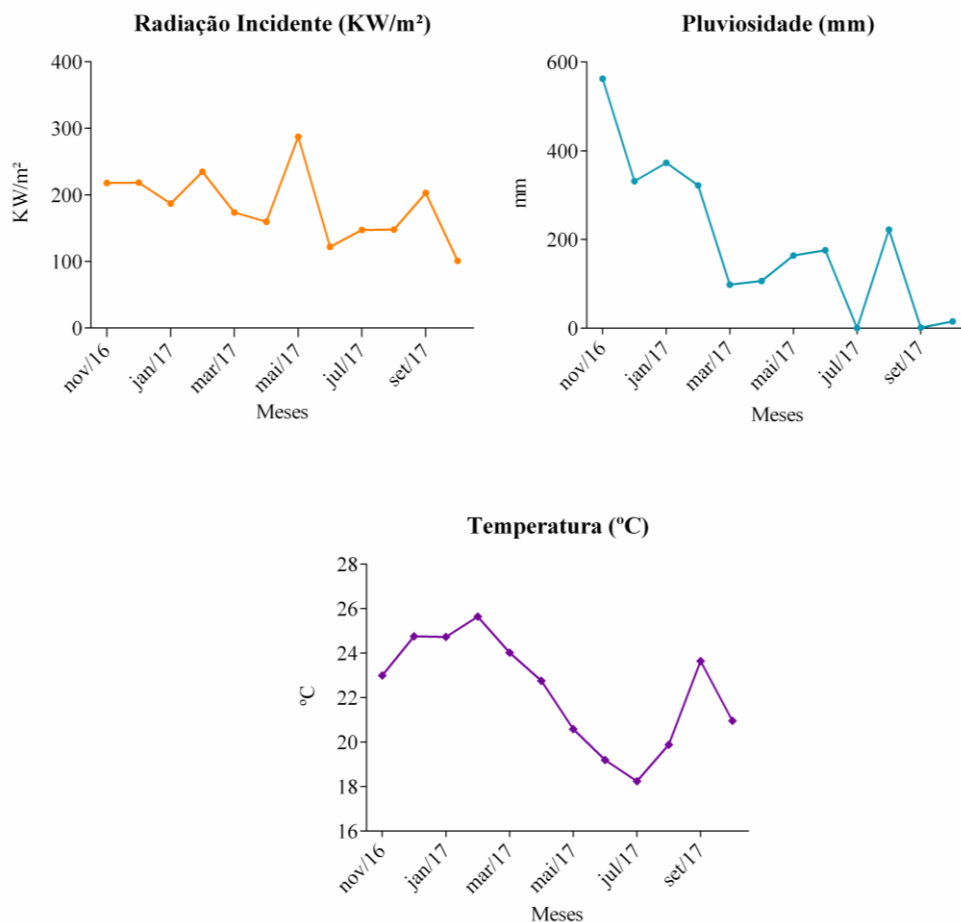


Figura 15. Médias mensais da Radiação Incidente, Pluviosidade e Temperatura durante o ano de coleta

Nozzolillo *et al.* (1989), por exemplo, verificaram mudanças sazonais nos constituintes fenólicos de indivíduos de *Pinus banksiana*, no qual foi observado que as temperaturas mais baixas estimularam maiores quantidades de proantocianidinas, composto pertencente ao grupo químico dos polifenóis, deixando as plantas com colorações mais arroxeadas em contraste com as épocas mais quentes ⁶⁸.

Christie *et al.* (1994), demonstraram em estudo com milho (*Zea mays*) que a exposição a baixas temperaturas também estimulou aumento de deposição de antocianinas nas plantas estudadas. Além disso, através de análises moleculares, os autores observaram que as temperaturas mais baixas aumentaram os níveis transcricionais dos genes envolvidos na via de fenilpropanóide e antocianina ⁶⁹.

Ambos os estudos tratam de temperaturas em torno de 10 °C a 25 °C, sendo os resultados mais impactantes obtidos nas plantas expostas à 15 °C. Se comparado com a

temperatura no mês de setembro e outubro, a média caiu de 24 °C para 20 °C, uma queda considerável, que poderia ter gerado aumento da *feature* M289T2 no mês de outubro (Figura 14 e Figura 15) para os indivíduos de *M. illicifolia* e do híbrido.

Por outro lado, Ellard-Ivey *et al.* (1996) e Gundlach *et al.* (1992), demonstraram que a aplicação de metil jasmonato induziu a transcrição de fenilalanina amonia liase (PAL) em culturas de células de soja e salsa, que por sua vez, estimulou acúmulo de compostos secundários, dentre eles, compostos fenólicos^{70,71}. Corroborando com tais resultados, em trabalho realizado por Campos-Vargas *et al.* (2001), observou-se que após dano em folhas de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Longifolia), a produção de sinais químicos levou a indução da síntese de PAL, e a acumulação de compostos fenólicos em células fora do sítio da injúria⁷².

Além disso, Heredia *et al.* (2008), em estudo realizado com cenouras (*Daucus carota*), demonstraram que a exposição à metil jasmonato e etileno, mesmo em plantas que não sofreram injúria, pode levar a uma leve alteração nos níveis de compostos fenólicos, o que também poderia explicar o aumento na intensidade da *feature* M289T2 nos indivíduos que não sofreram poda accidental⁷³.

Com relação à *feature* M625T11, que possivelmente, se trata de um flavonóide monoglicosilado (**Tabela 3**), foi observada diferença estatística evidente em *M. aquifolium*, apresentando maior intensidade no mês de maio, no qual houve um grande pico de radiação incidente (Figura 12 e Figura 15). De acordo com a literatura, os flavonóides são compostos cuja produção é maior em exposição à raios UV^{74,75}.

Chappel *et al.* (1984), por exemplo, demonstraram que em resposta à radiação UV, culturas de células de *Petroselinum hortense* tiveram a síntese de flavonóides e furanocoumarinas induzida, através da indução da enzima PAL⁷⁴. Corroborando com tais resultados, Li *et al.* (1993), demonstraram que radiação UV-B induziu a produção de compostos derivados de fenilalanina, que possivelmente têm um papel importante na proteção contra radiação devido à capacidade de absorção dos raios UV-B⁷⁵.

As *features* M689T7 e M703T7 dos indivíduos híbridos, podem ter aumentado de intensidade também devido ao clima do mês de outubro, porém, a ausência de dados da literatura não permite sua identificação parcial e consequentemente limita sua discussão. Apesar de tais *features* apresentarem diferença estatística somente nos indivíduos híbridos, a Figura 7 mostra sua maior intensidade nos indivíduos da espécie *M. aquifolium*. Neste caso,

portanto, tais *features* poderiam ser novos marcadores da espécie, não encontrados anteriormente na literatura.

Desta forma, com os análises estatísticas de PCA, ANOVA e Tukey é possível afirmar que todas as 24 *features* tiveram um papel importante na distinção entre as espécies de Espinheira Santa. As diferenças entre espécies foram maiores que possíveis diferenças sazonais. Além disso, apenas 4 das *features* detectadas mostraram variação significativa, observada através de um aumento da intensidade de M289T2, M689T7 e M703T7 no mês de outubro – que podem estar relacionadas à poda accidental, à sinalização química ou ao clima deste mês – e de M625T1 no mês de maio – que pode estar relacionada à resposta ao aumento da radiação incidente no mês em questão.

1.5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível afirmar que as diferenças químicas entre as espécies foi mais significativa que uma possível variação química sazonal e o híbrido derivado do cruzamento entre ambas, mostrou maior semelhança com a espécie *M. aquifolium*. Além disso, foi observado que todas as 24 *features* tiveram um papel importante nas separações observadas por PCA, sendo as 8 *features* mais intensas na espécie *M. aquifolium*, das quais duas não foram descritas anteriormente e 10 *features* mais intensas na espécie *M. ilicifolia*.

Entretanto, apenas as *features* de *m/z* 289 (identificada como epicatequina), 689 e 703 mostraram variação mensal significativa observada através de um aumento de suas intensidades no mês de outubro em relação a todos os outros meses e a *feature* de *m/z* 625 (parcialmente identificada como flavonoide glicosilado) que apresentou maior intensidade no mês de maio.

Tais variações podem (i) ser resultado das diferenças climáticas observadas em tais meses, no qual houve queda na temperatura e radiação incidente médias e (ii) estarem relacionadas à resposta à injúria e sua consequente sinalização entre diferentes plantas, capaz de alterar a composição química de indivíduos não submetidos à poda.

Parte 2 -

Atividade Biológica

3.1. INTRODUÇÃO

A família Celastraceae contém inúmeras espécies com potencial medicinal que são utilizadas pela população especialmente da Ásia e América Latina. Em 1997, já estavam registrados na base de dados do NAPRALERT® os usos etnomédicos de 43 espécies pertencentes à esta família ⁷⁶.

No Brasil, os gêneros mais estudados dentro da família Celastraceae são *Maytenus* e *Austroplenckia*. Na medicina popular brasileira, uma das plantas mais utilizadas é conhecida como “Espinheira Santa”, cujo nome científico abrange principalmente as espécies *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss e *Maytenus aquifolium* Mart, amplamente utilizadas para o tratamento gastrites e dispepsias.

A Espinheira Santa foi descrita na 4ª edição da Farmacopéia Brasileira em 2005, e é um dos 810 itens fornecidos pelo Sistema Único de Saúde ⁷⁷, sendo utilizada pela população desde a década de 1920, quando se tem os primeiros registros escritos de sua utilização ⁷⁸. Inúmeros trabalhos comprovaram que a *M. ilicifolia* e a *M. aquifolium* possuem diversos efeitos medicinais, dentre eles: antioxidante⁷⁹⁻⁸¹, antimicrobiano^{21,82}, antitumoral⁸³⁻⁸⁶, e principalmente gastroprotetor e antiulcerogênico ⁶⁻¹⁰.

Sua potente atividade antiulcerogênica foi demonstrada por Souza-Formigoni *et al.* (1991) ⁶, em estudo comparando os efeitos da administração, por via oral e intraperitoneal, da infusão das folhas de ambas as espécies de *Maytenus* com os efeitos da administração de ranitidina e cimetidina, as principais drogas usadas para o tratamento de distúrbios gástricos na época. Foi evidenciado que ambas as espécies de *Maytenus* possuem atividade comparável e, em alguns casos, até superior à dos medicamentos-controle, aumentando o volume do suco gástrico e o pH do mesmo.

Corroborando com os resultados de Souza-Formigoni, em estudo realizado por Tabach *et al.* (2003) ⁷, também se observou um aumento significativo do volume e pH da secreção gástrica em ratos tratados com extrato hidroalcoólico de *M. ilicifolia* nas doses de 140, 280 e 420 mg/kg via intraperitoneal, confirmando a atividade antiulcerogênica da planta.

Outro estudo, realizado com a espécie *Maytenus aquifolium*, por Gonzales *et al.* (2001) ⁸, também demonstrou tal efeito em alguns modelos de úlcera gástrica. Foi observado que o extrato metanólico a uma concentração de 1000 mg/kg apresentou efeito analgésico e

reduziu drasticamente as feridas gástricas no modelo de úlcera induzido por etanol.

Além disso, Oliveira *et al.* (1991) ¹⁰ demonstraram a ausência de efeitos tóxicos a curto e longo prazo após a administração de extratos aquosos de ambas as espécies de *Maytenus*. Não foi observada malformação congênita, alteração no sono ou no período de gravidez, mudança no peso ou na capacidade locomotora ou qualquer efeito comportamental nos animais submetidos ao teste, o que demonstra que os tratamentos realizados com extratos de *Maytenus* não oferecem risco.

Esta atividade antiulcerogênica e gastroprotetora das espécies de *Maytenus* pode estar relacionada à suas propriedades antioxidantes. De acordo com Wallace *et al.* (2008) ¹¹ a mucosa do estômago é permanentemente submetida a condições extremas, porém pode manter-se íntegra e funcional, devido a determinados mecanismos de defesa. Entre estes mecanismos pode-se destacar o sistema de defesa antioxidante que tem a finalidade de evitar que grandes concentrações de radicais livres ocasionem danos celulares ⁸⁷.

Os radicais livres são moléculas ou fragmentos de moléculas que contém um ou mais elétrons desemparelhados em suas órbitas ⁸⁸. Tais elétrons concedem reatividade ao radical livre e a classe considerada de maior importância nos organismos vivos é o radical derivado de oxigênio, ou espécie reativa de oxigênio (ROS) ⁸⁹.

Os ROS (1) são gerados durante irradiação por luz UV, raios X e raios gamma; (2) são produtos de reação catalizadas por metais; (3) estão presentes como poluentes da atmosfera; (4) são produzidos por neutrófilos e macrófagos durante inflamação e (5) são produtos de reações da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Além disso, são conhecidos por desempenhar papéis duplos, gerando tanto benefícios como efeitos deletérios aos organismos vivos ⁹⁰.

Apesar da presença de um sistema de defesa antioxidante para contrabalancear os efeitos deletérios dos ROS, o acúmulo destas substâncias no organismo humano tem sido associado a inúmeras doenças como câncer, doenças neurodegenerativas e tem sido, além disso, associado à patogênese da lesão da mucosa gástrica ⁹⁰. Nestes casos, ocorrem reações que geram ROS e sua elevada produção e acúmulo ocasionam danos e alterações celulares graves, incluindo danos à lipídios, membranas, proteínas o que caracteriza um quadro de estresse oxidativo ^{87,90-92}.

Segundo Suzuki *et al.* (2012), existem evidências concretas que correlacionam este estado de estresse oxidativo com mecanismos que originam inúmeras afecções gástricas, tais como gastrites, úlceras pépticas e carcinomas. Estas afecções segundo Al-Mofleh (2010), podem ser tratadas por substâncias que possuem atividade antioxidante ^{12,13}.

Neste sentido Melo *et al.* (2001) ⁷⁹, por exemplo, demonstraram que os extratos de *M. ilicifolia* desempenharam papel essencial de proteção celular contra a ação letal de SnCl₂, em células de *Escherichia coli*. O cloreto de estanho (SnCl₂) é usado em vários processos industriais como um agente redutor para marcar estruturas celulares e moleculares de interesse biológico e pode agir direta ou indiretamente, podendo formar ROS como intermediários. De acordo com os autores, a ação protetora dos extratos de *M. ilicifolia* podem ser resultado de suas propriedades redox, nos quais seus compostos poderiam (1) quelar os íons de estanho, protegendo-os de oxidação e evitando geração de ROS; (2) eliminar os ROS gerados pela oxidação de SnCl₂ e/ou (3) possuir compostos capazes de oxidar os íons de estanho, reduzindo ou abolindo o efeito de SnCl₂.

Em outro estudo, realizado por Velloso *et al.* (2007) ⁸⁰, foi observado que o extrato etanólico de *M. aquifolium* foi eficiente contra espécies reativas de oxigênio, sendo capaz de sequestrar diferentes espécies reativas. Os autores demonstraram tal atividade através de ensaios antioxidantes de DPPH e ABTS^{•+} e observando sua atividade sob ácido hipocloroso, radical superóxido e óxido nítrico.

Haida *et al.* (2012) ⁸¹ demonstraram em ensaios com DPPH, utilizando rutina, ácido gálico e ácido ascórbico como padrões antioxidantes que os extratos etanólicos e aquosos das folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* possuem alta atividade antioxidante, atribuídas ao poder sequestrante de radicais livres. De acordo com os autores, além disso os valores mais altos de atividade antioxidante foram apresentados pelos extratos etanólicos de ambas as espécies em relação aos extratos aquosos.

Desta forma, descreve-se aqui o estudo realizado com extratos aquosos de indivíduos de *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e híbridos, cuja composição química foi previamente analisada, com a finalidade de verificar sua atividade antioxidante pelos ensaios de DPPH e ORAC.

3.2. OBJETIVO

Avaliar a atividade antioxidante de extratos das folhas e caules de *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e seu híbrido, por dois métodos com mecanismos diferentes: DPPH e ORAC.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados utilizando-se 20 mg de folhas e caules liofilizados e triturados para 10 mL de água purificada Milli-Q, com apenas uma extração por 30 minutos em sonificador.

Com a finalidade de manter a concentração original dos extratos, estes foram filtrados o solvente foi eliminado por liofilização. Os extratos secos foram preparados para os testes antioxidantes de DPPH e ORAC_{FL} seguindo o protocolo específico para cada ensaio.

3.3.2. Atividade antioxidante por DPPH

As análises da atividade antioxidante por DPPH foram realizadas no Departamento de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia – UNICAMP, no laboratório do Prof. Dr. Marcelo Menossi.

O ensaio antioxidante por DPPH se baseia na medida do decaimento da absorbância em 517 nm da solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) contendo substâncias antirradicais. O DPPH é um radical livre estável que apresenta a coloração violeta e absorve luz no comprimento de onda na faixa de 515 a 520 nm. Quando esse composto está na presença de uma substância antioxidante, o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio do DPPH recebe um elétron do hidrogênio do antioxidante. Essa reação provoca uma mudança na coloração do DPPH, que passa a ser amarelo e sua absorbância em 517 nm diminui ⁹³. A Figura 16 ilustra a reação de oxirredução do DPPH em presença da quercetina, substância utilizada como padrão antioxidante (Figura 16).

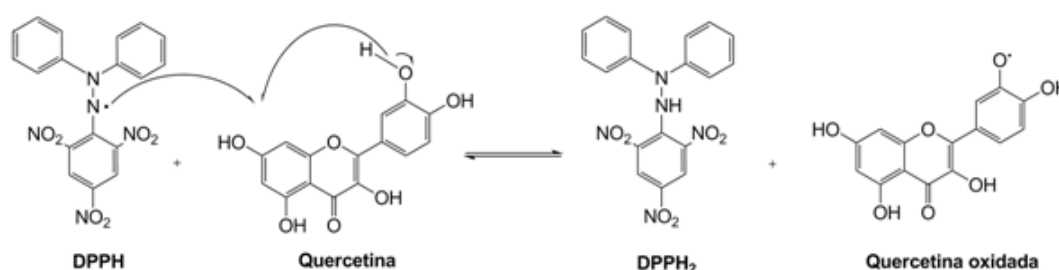


Figura 16. Reação de oxirredução do DPPH na presença de quercetina

O experimento foi realizado em uma placa de microdiluição de 96 poços de acordo com a metodologia descrita por Huang et al. (2005) e Cabral *et al.* (2009) ^{94,95}.

Para cada amostra foram feitas diluições seriadas para obter uma concentração final de amostra que variou entre 200 µg/mL até 6,25 µg/mL. Em cada poço da placa foram adicionados 100 µL de tampão acetato 0,1M (pH 5,5), e 50 µL de uma solução etanólica de DPPH ($2,77 \times 10^{-4}$). Como controle positivo para a atividade antioxidante foi utilizado padrão de quercetina, preparado da mesma forma que as amostras e seguindo as mesmas concentrações. Como controle negativo para a atividade antioxidante foi utilizado somente etanol.

O progresso da reação foi medido pela absorbância usando um espectrofotômetro ($\lambda = 517$ nm) realizando medidas a cada 10 minutos durante um total de 60 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.3. Atividade antioxidante por ORAC_{FL}

As análises da atividade antioxidante por ORAC foram realizadas no Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN) da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, no laboratório do Prof. Mário Roberto Maróstica Júnior.

A capacidade antioxidante dos extratos também foi mensurada pelo ensaio ORAC_{FL}, utilizando-se fluoresceína como sonda fluorescente e AAPH (cloreto de (2,2'-azobis (2-amidiopropano) como fonte de radicais livres. O método consiste na medida do decréscimo da fluorescência da fluoresceína, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer danos oxidativos. Quando um composto antioxidante é adicionado, este reage com os radicais, doando um átomo de hidrogênio e inibe, assim, a perda de intensidade da fluorescência. Os experimentos foram realizados em placas opacas de microdiluição de 96 poços de acordo com metodologia descrita por Ou *et al.* (2001) e Prior *et al.* (2003)^{96,97}.

Para tanto, os extratos liofilizados foram diluídos 100, 200, 250 e 400 vezes com tampão fosfato (pH 7,05). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), análogo da vitamina E, é usado como substância de referência nas concentrações de 5 a 100 mM, empregando-se o mesmo sistema diluente. Para a montagem das placas, primeiramente, foram adicionados 25 µL de cada diluição de amostra e 150 µL de fluoresceína, a placa foi incubada a 37 °C durante 15 minutos. Após esse tempo adicionou-se 25 µL de AAPH e imediatamente iniciaram-se as leituras com filtro fluorescente (excitação $\lambda = 485$ nm e emissão $\lambda = 528$ nm) em leitor de microplaca monitorando-se a cinética de reação a cada 2 minutos por um período de 70 minutos (temperatura = 37 °C).

3.3.4. Estatística

Os resultados do teste de DPPH foram expressos em valor de EC₅₀. Para isso, inicialmente foi calculada a redução do DPPH de acordo com a seguinte equação:

$$\% DPPH = 100 - [(A_{amostra} - A_{branco}) \times 100 / A_{controle}],$$

Sendo $A_{amostra}$: absorvância da amostra; A_{branco} : absorvância da solução de diluição; $A_{controle}$: absorvância da solução de DPPH.

Posteriormente, foi calculada a equação da hipérbole a partir do valor da porcentagem de redução do DPPH, e com esses dados se obteve o valor de EC₅₀ (concentração efetiva 50%) para cada amostra, através da fórmula EC₅₀ é definido como a concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais de DPPH ⁹⁴.

Os resultados do teste ORAC foram expressos como μmol de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato (μmol de TE/g). Como controle positivo utilizou-se a fluoresceína e como controle negativo o tampão fosfato utilizado para diluição. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Foram realizadas análises por ANOVA com os valores de Trolox equivalente e EC₅₀ para verificar se haviam diferenças estatísticas entre os valores antioxidantes encontrados para cada amostra analisada em cada ensaio antioxidante

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que não foram demonstrados agrupamentos por sazonalidade nas análises químicas (**Parte 1 – Metabolômica**), foram testadas as atividades antioxidantes de extratos representativos de *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e dos híbridos, bem como de dois agrupamentos observados por PCA (indivíduos *M. ilicifolia* de setembro e outubro, e indivíduos híbridos semelhantes à *M. ilicifolia*) (Figura 4).

Para isso, foi feito um *pool* de todos os meses para cada espécie, para os indivíduos de *M. ilicifolia* de setembro e outubro e para o indivíduo híbrido 4 de todos os meses, totalizando 5 grupos para os testes antioxidantes de ORAC e DPPH.

3.4.1. Atividade Antioxidante por DPPH

Analisando os ensaios de DPPH, através dos dados de EC₅₀ fornecidos e dos testes estatísticos por ANOVA e Tukey realizados com tais valores é possível perceber que a espécie *M. ilicifolia* mostrou acentuada capacidade antioxidante (menor valor de EC₅₀) (Tabela 4). Os indivíduos híbridos e de *M. aquifolium*, por sua vez, apresentaram atividade semelhante sem diferença estatística significativa, coincidindo com os resultados obtidos através das análises por PCA, nas quais ficou evidente a semelhança na composição química entre ambos (Tabela 4).

Tabela 4. EC₅₀ dos extratos das folhas das três espécies de Espinheira Santa e do padrão Quercetina. Menores valores de EC₅₀ indicam maior atividade antioxidante.

EC ₅₀ (µg/mL)	
Quercetina	0,70 ± 0,04
<i>M. aquifolium</i> – Folha	6,86 ± 0,28
<i>M. ilicifolia</i> – Folha	3,16 ± 0,46
Híbrida – Folha	7,03 ± 1,96
<i>M. ilicifolia</i> – Folha Set/Out	6,09 ± 0,35
Híbrida – Indivíduo 4	2,34 ± 0,46

Porém, ao analisar o indivíduo híbrido 4, cuja composição química mais se assemelhou à *M. ilicifolia*, foi possível perceber uma maior atividade antioxidante, mostrando um valor de EC₅₀ até menor que a espécie parental e sem diferença significativa da atividade da quercetina ($p < 0.05$). Ao analisar, por outro lado, os indivíduos de setembro e outubro de *Maytenus ilicifolia*, que sofreram poda accidental, o valor de EC₅₀ aumenta, indicando piora na atividade antioxidante que apresentando semelhança estatística aos valores de *M. aquifolium* e da Híbrida (Tabela 4).

Foram também realizadas análises antioxidantes dos extratos aquosos de caules das três espécies, preparados da mesma forma que os extratos das folhas, a fim de comparar suas atividades, uma vez que somente as folhas são indicadas e recomendadas para uso na medicina popular de acordo com o Formulário Fitoterápico ⁹⁸. Foi observado que o caule apresentou uma atividade antioxidante mais acentuada se comparada com as folhas, o que poderia indicar que os caules também podem ser utilizados para tratamento de distúrbios gástricos e talvez seu uso seja mais eficiente que o uso de folhas, uma vez que sua atividade não mostra diferença estatística em relação à atividade da quercetina.

Tabela 5. EC₅₀ dos extratos do caule das três espécies de Espinheira Santa e do padrão Quercetina. Menores valores de EC₅₀ indicam maior atividade antioxidante.

EC ₅₀ (µg/mL)	
Quercetina	0,70 ± 0,04
<i>M. aquifolium</i> – Caule	0,12 ± 0,05
<i>M. ilicifolia</i> – Caule	0,25 ± 0,17
Híbrida – Caule	0,46 ± 0,24

Os resultados obtidos no presente trabalho são semelhantes ao observado por Haida *et al.* (2012), no qual foram realizados ensaios antioxidantes por DPPH e quantificação de polifenóis totais nas espécies *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*. De acordo com os autores ambas as espécies possuem grande atividade antioxidante, comparável inclusive aos padrões utilizados (rutina, ácido gálico e ácido ascórbico) ⁸¹.

Além disso, tanto no trabalho de Haida *et al.* (2012), quanto de Pereira *et al.* (2005), foi observado que a espécie *M. ilicifolia* possui maior teor de fenóis e taninos, se comparado com a espécie *M. aquifolium*, o que poderia explicar a diferença entre a atividade antioxidante observada no presente trabalho ^{81,99}.

Com relação à atividade antioxidante observada nos extratos de caule não foram encontrados relatos na literatura, limitando a discussão neste sentido.

3.4.2. Atividade Antioxidante por ORAC_{FL}

Analisando os resultados dos ensaios de ORAC_{FL}, através dos dados fornecidos, é possível perceber que os resultados de atividade antioxidante foram, em alguns aspectos, contrários aos do ensaio por DPPH. Foram feitas análises por ANOVA e teste Tukey com os valores de equivalência de Trolox obtidos e foi observado que as amostras de *M. ilicifolia*, *M. aquifolium*, *M. ilicifolia* de setembro e outubro e indivíduo híbrido 4 mostraram atividades semelhantes sem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). Por outro lado, os indivíduos Híbridos apresentaram a melhor atividade antioxidante (maior valor de equivalência de Trolox) (Tabela 4 e Tabela 6).

Desta forma, ao contrário do observado no ensaio por DPPH, em que *M. ilicifolia* e o indivíduo Híbrido 4 mostraram maior atividade, o teste por ORAC demonstrou que os indivíduos Híbridos como um todo apresentaram maiores valores de equivalência de Trolox, possuindo, portanto, atividade antioxidante mais acentuada. O indivíduo Híbrido 4, por sua vez, como mencionado anteriormente, demonstrou atividade semelhante ($p < 0.05$) à *M. aquifolium*, contrário ao observado no ensaio de DPPH e nas análises químicas. (Tabela 4 e Tabela 6).

Tabela 6. Equivalência de Trolox dos extratos de folhas das espécies de Espinheira Santa pelo ensaio ORAC. Maiores valores de equivalência indicam maior atividade antioxidante.

Equivalência de Trolox (μmol de TE/mg de extrato)	
<i>M. aquifolium</i> – Folha	$1,33 \pm 0,19$
<i>M. ilicifolia</i> – Folha	$0,86 \pm 0,19$
Híbrida – Folha	$2,20 \pm 0,26$
<i>M. ilicifolia</i> – Folha Set/Out	$0,99 \pm 0,22$
Híbrida – Indivíduo 4	$1,10 \pm 0,13$

Foram também realizados ensaios ORAC_{FL} com os extratos dos caules das três espécies e através dos dados de equivalência de Trolox fornecidos na Tabela 7, é possível observar que todas as amostras apresentaram atividade antioxidante estatisticamente similar ($p < 0.05$) e menos acentuada, diferentemente ao resultado do ensaio por DPPH, no qual foi observada melhora na atividade antioxidante nos extratos de caule, em comparação aos extratos das folhas.

Tabela 7. Equivalência de Trolox dos extratos dos caules das espécies de Espinheira Santa pelo ensaio ORAC. Maiores valores de equivalência indicam maior atividade antioxidante.

Equivalência de Trolox (μmol de TE/mg de extrato)	
<i>M. aquifolium</i> – Caule	$0,84 \pm 0,22$
<i>M. ilicifolia</i> – Caule	$0,59 \pm 0,36$
Híbrida – Caule	$1,18 \pm 0,30$

Tais diferenças nos resultados obtidos entre os ensaios pode ser explicada devido às diferenças nos mecanismos antioxidantes envolvidos em cada ensaio. De acordo com Huang

et al. (2005)⁹⁴, os ensaios antioxidantes podem ser separados em dois grandes grupos, dependendo de seu mecanismo de ação: ensaios de transferência de átomo de hidrogênio (HAT) e ensaios de transferência de elétron (ET) .

O ensaio antioxidante por DPPH pode ser classificado dentro do grupo ET, uma vez que sua reação envolve transferência de elétron entre o composto antioxidante e o radical DPPH. Sua finalidade é verificar a capacidade da substância antioxidante de degradar a fonte de radicais livres (DPPH)^{94,100}.

O ensaio por ORAC, por sua vez, pode ser classificado no grupo HAT, devido à perda do átomo de hidrogênio da substância antioxidante para a fonte de radicais livres (AAPH). Este ensaio tem como a finalidade verificar a capacidade da substância antioxidante de proteger a sonda fluorescente (fluoresceína)^{94,100}.

Além disso, em trabalho realizado com Roy *et al.* (2010)¹⁰⁰, foi verificado que a presença de galato de epigallocatequina tem influência em ensaios de DPPH, apresentando maior capacidade antioxidante, enquanto que o composto epicatequina tem mais influência no ensaio ORAC.

Deste modo, diferentes compostos encontrados nas amostras atuam de forma mais eficiente por uma via ou por outra.

3.5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que o extrato aquoso das folhas e caules de ambas as espécies de *Maytenus* e seus híbridos possuem atividade antioxidante acentuada, confirmando os resultados observados na literatura. Entretanto, a atividade observada para os extratos do caule sugerem que a forte atividade antioxidante desta parte da planta possa ser eficiente no tratamento de gastrites e dispepsias. Devido à falta de estudos com esta parte da planta é necessário maior elucidação de sua composição e posterior verificação de variação sazonal.

Além disso, foi possível observar que as espécies, apesar de possuírem atividade antioxidante em ambos os ensaios, mostraram eficiência distinta para cada um, uma vez que os ensaios de DPPH e ORAC_{FL} avaliam a atividade antioxidante das substâncias através de mecanismos distintos. Tais diferenças indicam que as espécies estudadas possivelmente podem ser usadas de forma distinta, dependendo da situação e do tipo de lesão gástrica.

Por fim, é possível concluir que os indivíduos híbridos derivados do cruzamento entre *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* podem ser bons substitutos à espécie *M. ilicifolia*, atualmente ameaçada de extinção e seu cultivo pode ser uma boa fonte de fitoterápicos a fim de poupar as espécies parentais.

Conclusão Geral

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as diferenças na composição química de ambas as espécies e do híbrido são maiores que suas possíveis variações sazonais. Da mesma forma que se observam diferenças morfológicas entre elas, é possível verificar grandes diferenças em sua composição química, como foi possível observar pelas análises de metabolômica. Os indivíduos híbridos, por sua vez, possuem maior semelhança com a espécie *M. aquifolium*, tanto na morfologia quanto na composição química.

Entretanto, foi observado que nos meses de outubro e maio houveram mudanças nas intensidades de 4 *features* nas duas espécies parentais e nas híbridas. As *features* M289T2, M689T7 e M703T apresentaram maiores intensidades no mês de outubro em relação a todos os outros meses e a *feature* M625T11 apresentou maior intensidade no mês de maio.

Tais variações podem ser resultado das diferenças climáticas observadas nesses meses, no qual houve queda na temperatura e radiação incidente médias no mês de outubro e aumento na radiação incidente no mês de maio. Por outro lado podem estar relacionadas à resposta à injúria e a consequente sinalização entre plantas, capaz de alterar a composição química de indivíduos não submetidos à poda.

Além disso, com base nos resultados, é possível considerar que as *features* de *m/z* 469, 451, 315, 625, 739, 593, 833, 755 e 289 sejam marcadores da espécie *M. ilicifolia* e as *features* de *m/z* 901, 917, 725, 703, 689, 369, 461 e 433 sejam marcadores de *M. aquifolium*, sendo que M689T7 e M703T7 não foram descritos na literatura anteriormente, podendo indicar a presença de compostos inéditos para a espécie em questão.

Com relação à atividade biológica foi demonstrado que ambas as espécies possuem atividade antioxidante, sendo complementares em relação aos dois mecanismos analisados nos ensaios. Enquanto os extratos aquosos de *M. ilicifolia* mostraram maior atividade em ensaios de DPPH, os extratos aquosos de *M. aquifolium* apresentam maior eficiência em ensaios de ORAC_{FL}.

Os extratos de caule de ambas as espécies também apresentaram acentuada atividade antioxidante, sendo inclusive maior que o extrato das folhas, sugerindo que o uso desta parte da planta possa ser eficiente no tratamento de gastrites e dispepsias. Entretanto, a ausência de trabalhos na literatura confirmando tais resultados torna sua discussão limitada.

Perspectivas

Como perspectivas seria necessário (i) realizar mais análises biológicas dos extratos de caules das duas espécies e seus híbridos; (ii) realizar mais estudos com o híbrido para verificar se de fato pode ser utilizado como substituto da espécie *M. ilicifolia*; (iii) realizar as análises químicas metabolômicas dos extratos dos caules com a finalidade de verificar se sua atividade mais intensa está relacionada à compostos distintos ou a intensidade de compostos já encontrados nos extratos das folhas; (iv) realizar análises em alta resolução das *features* M689T7 e M703T7 a fim de identifica-las;

Além disso, os resultados apresentados levantam questões com relação a taxonomia de ambas as espécies e estudos nesta área poderiam revelar se *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* podem ser, de fato, consideradas como espécies distintas uma vez que geram um híbrido fértil e viável.

O presente trabalho, entretanto, demonstrou que ao se analisar todo o perfil metabólico das espécies de Espinheira Santa, ao invés de apenas alguns de seus compostos alvo, foi possível obter uma visão mais abrangente da complexidade dos processos bioquímicos que podem estar relacionados à sazonalidade, injúria ou especificidade taxonômica. Baseado nos resultados de metabolômica *untargeted* deste estudo é possível, portanto, realizar estudos futuros de forma mais direta, com estratégias *targeted*, principalmente em se tratando do híbrido, pouco explorado na literatura.

Referências Bibliográficas

1. Solecki, R. S. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in Northern Iraq. *Science* (80-.). **190**, 880–881 (1975).
2. Sedrez dos Reis, M. & Ribeiro Silva, S. *Conservação e uso sustentável de plantas medicinais aromáticas: Maytenus spp., espinheira-santa*. (2004).
3. Mabberley, D. J. *The plant-book : A portable dictionary of the vascular plants*. (1997).
4. Pereira, A. M. S. *et al.* Effect of fertilization on morphologic characteristics and secondary metabolites of *Maytenus aquifolium* Mart. *J. Herbs. Spices Med. Plants* **3**, 43–50 (1995).
5. Spivey, A. C., Weston, M. & Woodhead, S. Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **31**, 43–59 (2002).
6. Oliveira Souza-Formigoni, M. L. *et al.* Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* **34**, 21–27 (1991).
7. Tabach, R. & Oliveira, W. P. Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of a dry extract of *Maytenus ilicifolia* Martius ex. Reiss produced by a Jet Spouted Bed Dryer. *Pharmazie* **58**, 573–576 (2003).
8. Gonzalez, F. G., Portela, T. Y., Stipp, E. J. & Di Stasi, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *J. Ethnopharmacol.* **77**, 41–47 (2001).
9. Ferreira, P. M. *et al.* A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. *Planta* **219**, 319–324 (2004).
10. Oliveira, M. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* **34**, 29–41 (1991).
11. Wallace, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't

- the stomach digest itself? *Physiol. Rev.* **88**, 1547–65 (2008).
12. Suzuki, H., Nishizawa, T., Tsugawa, H., Mogami, S. & Hibi, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *J Clin Biochem Nutr.* **49**, 174–181 (2011).
 13. Al Mofleh, I. A. Spices, herbal xenobiotics and the stomach: Friends or foes? *World J. Gastroenterol.* **16**, 2710–2719 (2010).
 14. Cordeiro, P. J. M., Vilegas, J. H. Y. & Lanças, F. M. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ('Espinheira Santa'). *J. Braz. Chem. Soc.* **10**, 523–526 (1999).
 15. Mossi, A. J. *et al.* Variabilidade química de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de populações nativas de *Maytenus ilicifolia*. *Quim. Nova* **33**, 1067–1070 (2010).
 16. H Itokawa, O. Shiota, H. Morita, K Takeya, N Tomika, A. I. New triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. *Tetrahedron Lett.* **31**, 6881–6882 (1990).
 17. Itokawa, H. *et al.* Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry* **30**, 3713–3716 (1991).
 18. Pessuto, M. B. Análise fitoquímica de extrato de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss e avaliação do potencial antioxidante. (Universidade Estadual de Maringá, 2006).
 19. Mendes, B. G., Machado, M. J. & Falkenberg, M. Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* **16**, 568–575 (2006).
 20. Tiberti, L. A., Yariwake, J. H., Ndjoko, K. & Hostettmann, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. *J. Chromatogr. B* **846**, 378–384 (2007).
 21. Colacite, J. Triagem fitoquímica, análise antimicrobiana e citotóxica e dos extratos das plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellanedae*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Saúde e Pesqui.* **8**, 509 (2015).

22. Pereira, A. M. S., Rodrigues, D. C., Cerdeira, R. M. & França, S. C. Isolamento de metabólitos de *Maytenus* associadas à ação anti-úlceras gástrica. in *12º. Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil* (1993).
23. Ming, L. C., Castro, D. M. & Delachiave, M. E. *Plantas medicinais aromáticas e condimentares*. (1998).
24. Leite, J. P. V. *et al.* Constituents from *Maytenus ilicifolia* leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. *J. Braz. Chem. Soc.* **21**, 248–254 (2010).
25. Sneden, A. T. & Beemsterboer, G. L. Normaytansine, a new antileukemic ansa macrolide from *Maytenus buehneri*. *J. Nat. Prod.* **43**, 17–20 (1980).
26. Niero, R. *et al.* A comparative chemical study of *Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss and *Maytenus robusta* Reiss (Celastraceae). *Z. Naturforsch* **56c**, 158–161 (2001).
27. Di Stasi, L. C. Controle de qualidade de plantas medicinais. in *Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar* (1996).
28. Flück, H. The influence of the climate on the active principles in medicinal plants. *J. Pharm. Pharmacol.* **7**, 361–383 (1955).
29. Baron, C. & Zambryski, P. C. The plant response to pathogenesis, symbiosis and wounding: Variations on a common theme? *Annu. Rev. Genet.* **29**, 107–129 (1995).
30. Edwards, P. J. & Wratten, S. D. Wound induced defences in plants and their consequences for patterns of insect grazing. *Oecologia* **59**, 88–93 (1983).
31. Sun, M. *et al.* Metabolic flux enhancement and transcriptomic analysis displayed the changes of catechins following long-term pruning in Tea Trees (*Camellia sinensis*). *J. Agric. Food Chem.* **66**, 8566–8573 (2018).
32. Karban, R. & Myers, J. J. H. Induced plant responses to herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **20**, 331–348 (1989).
33. Ke, S. W., Chen, G. H., Chen, C. T., Tzen, J. T. C. & Yang, C. Y. Ethylene signaling

- modulates contents of catechin and ability of antioxidant in *Camellia sinensis*. *Bot. Stud.* **59**, (2018).
34. Yariwake, J. H. *et al.* Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* **15**, 162–168 (2005).
 35. Verhoeven, H. A., Ric de Vos, C. H., Bino, R. J. & Hal, R. D. Plant metabolomics strategies based upon quadrupole time of flight mass spectrometry (QTOF-MS). in *Plant Metabolomics* 36–46 (2006).
 36. Hall, R. D. Plant metabolomics: From holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol.* **169**, 453–468 (2006).
 37. Dunn, W. B., Broadhurst, D. I., Atherton, H. J., Goodacre, R. & Griffin, J. L. Systems level studies of mammalian metabolomes: The roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 387–426 (2011).
 38. Dunn, W. B. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Phys. Biol.* **5**, (2008).
 39. Baker, M. Metabolomics: From small molecules to big ideas. *Nat. Methods* **8**, 117–121 (2011).
 40. Patti, G. J. Separation strategies for untargeted metabolomics. *J. Sep. Sci.* **34**, 3460–3469 (2011).
 41. Orešč, M., Rischer, H. & Oksman-Caldentey, K.-M. Metabolomics of Plant Secondary Compounds: Profiling of Catharanthus Cell Cultures. in *Biotechnology in Agriculture and Forestry - Plant Metabolomics* 277–289 (Springer, 2006).
 42. Lörz, H. & Widholm, J. M. *Biotechnology in Agriculture and Forestry - Plant Metabolomics*. (Springer, 2006).
 43. Seigler, D. S. *Plant Secondary Metabolism*. (Springer US, 2000).

44. Ramakrishna, A. & Ravishankar, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* **6**, 1720–1731 (2011).
45. Bennett, R. N. & Wallsgrove, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* **127**, 617–633 (1994).
46. Chalker-Scott, L. & Fenchigami, L. H. The role of phenolic compounds in plant stress responses. in *Low Temperature Stress Physiology in Crops* (1989).
47. Dixon, R. A. & Paiva, N. L. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085–1097 (1995).
48. Viant, M. R. Applications of metabolomics to the environmental sciences. *Metabolomics* **5**, 1–2 (2009).
49. Arbona, V., Manzi, M., de Ollas, C. & Gómez-Cadenas, A. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 4885–4911 (2013).
50. Mathew, A. K. & Padmanaban, V. C. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **5**, 45–48 (2013).
51. Roessner, U. *et al.* Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell Online* **13**, 11–29 (2001).
52. Fernie, A. R., Trethewey, R. N., Krotzky, A. J. & Willmitzer, L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 763–769 (2004).
53. De Vos, R. C. H. *et al.* Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2**, 778–791 (2007).
54. Oksman-Caldentey, K. M. & Inzé, D. Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* **9**, 433–440 (2004).
55. Forcisi, S. *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J. Chromatogr.*

- A **1292**, 51–65 (2013).
56. Glauser, G., Veyrat, N., Rochat, B., Wolfender, J. L. & Turlings, T. C. J. Ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry for plant metabolomics: A systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers. *J. Chromatogr. A* **1292**, 151–159 (2013).
 57. Guillarme, D., Nguyen, D. T. T., Rudaz, S. & Veuthey, J. L. Recent developments in liquid chromatography-Impact on qualitative and quantitative performance. *J. Chromatogr. A* **1149**, 20–29 (2007).
 58. Glish, G. L. & Vachet, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 140–150 (2003).
 59. Katajamaa, M. & Oresic, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J. Chromatogr. A* **1158**, 318–328 (2007).
 60. Courant, F., Antignac, J., Dervilly-pinel, G. & Bizec, B. Le. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics* **14**, 2369–2388 (2014).
 61. Alonso, A., Marsal, S. & Julià, A. Analytical methods in untargeted metabolomics : state of the art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 1–20 (2015).
 62. Niero, R., Andrade, S. F. De & Filho, V. C. A Review of the Ethnopharmacology , Phytochemistry and Pharmacology of Plants of the *Maytenus* Genus. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 1–21 (2011).
 63. de Souza, L. M. *et al.* Heart-cutting two-dimensional (size exclusion × reversed phase) liquid chromatography-mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J. Chromatogr. A* **1216**, 99–105 (2009).
 64. de Souza, L. M., Cipriani, T. R., Iacomini, M., Gorin, P. A. J. & Sasaki, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 59–67 (2008).

65. Baggio, C. H. *et al.* Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex . Reissek. *J. Ethnopharmacol.* **123**, 385–391 (2009).
66. Fonseca, A. P. N. D., Silva, G. D. F., Carvalho, J. de J., Salazar, G. D. C. M. & Duarte, L. P. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Quim. Nova* **30**, 842–847 (2007).
67. Hartley, S. E. & Lawton, J. H. Effects of different types of damage on the chemistry of birch foliage, and the responses of birch feeding insects. *Oecologia* **74**, 432–437 (1987).
68. Nozzolillo, C., Isabelle, P. & Das, G. Seasonal changes in the phenolic constituents of jack pine seedlings (*Pinus banksiana*) in relation to the purpling phenomenon. *Can. J. Bot.* **68**, 2010–2017 (1989).
69. Christie, P. J., Alfenito, M. R. & Walbot, V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways : Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* **194**, 541–549 (1994).
70. Ellard-Ivey, M. & Douglas, C. J. Role of Jasmonates in the Elicitor- and Wound-Inducible Expression of Defense Genes in Parsley and Transgenic Tobacco '. *Plant Physiol.* **112**, 183–192 (1996).
71. Gundlach, H., Muller, M. J., Kutchan, T. M. & Zenk, M. H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures C : *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 2389–2393 (1992).
72. Campos-vargas, R. & Saltveit, M. E. Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. *Physiol. Plant.* **114**, 73–84

- (2002).
73. Heredia, J. B. & Cisneros-zevallos, L. The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on pal activity , phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities. *Postharvest Biol. Technol.* **51**, 242–249 (2008).
 74. Chappel, J. & Hahlbrock, K. Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* **311**, 76–78 (1984).
 75. Li, J., Raba, R., Amundson, R. G. & Lastatbi, R. L. Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* **5**, 171–179 (1993).
 76. Gonzáles, A. G., Bazzocchi, I. L. & Jiménez, I. A. Ethnobotanical uses of Celastraceae. Bioactive metabolites. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **23**, 649–738 (2000).
 77. BRASIL. Ministério da Saúde. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014*. (2014).
 78. Santos-Oliveira, R., Coulaud-Cunha, S. & Colaço, W. Revisao da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Brazilian J. Pharmacogn.* **19**, 650–659 (2009).
 79. Melo, S. de F. *et al.* Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **496**, 33–38 (2001).
 80. Velloso, J. C. R. *et al.* Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **43**, 447–453 (2007).
 81. Haida, K. S. *et al.* Atividade antioxidante e compostos fenólicos de *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. *Rev. Saúde e Pesqui.* **5**, 360–368 (2012).
 82. Cunico, M. M. *et al.* Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* **12**, 69–73 (2002).

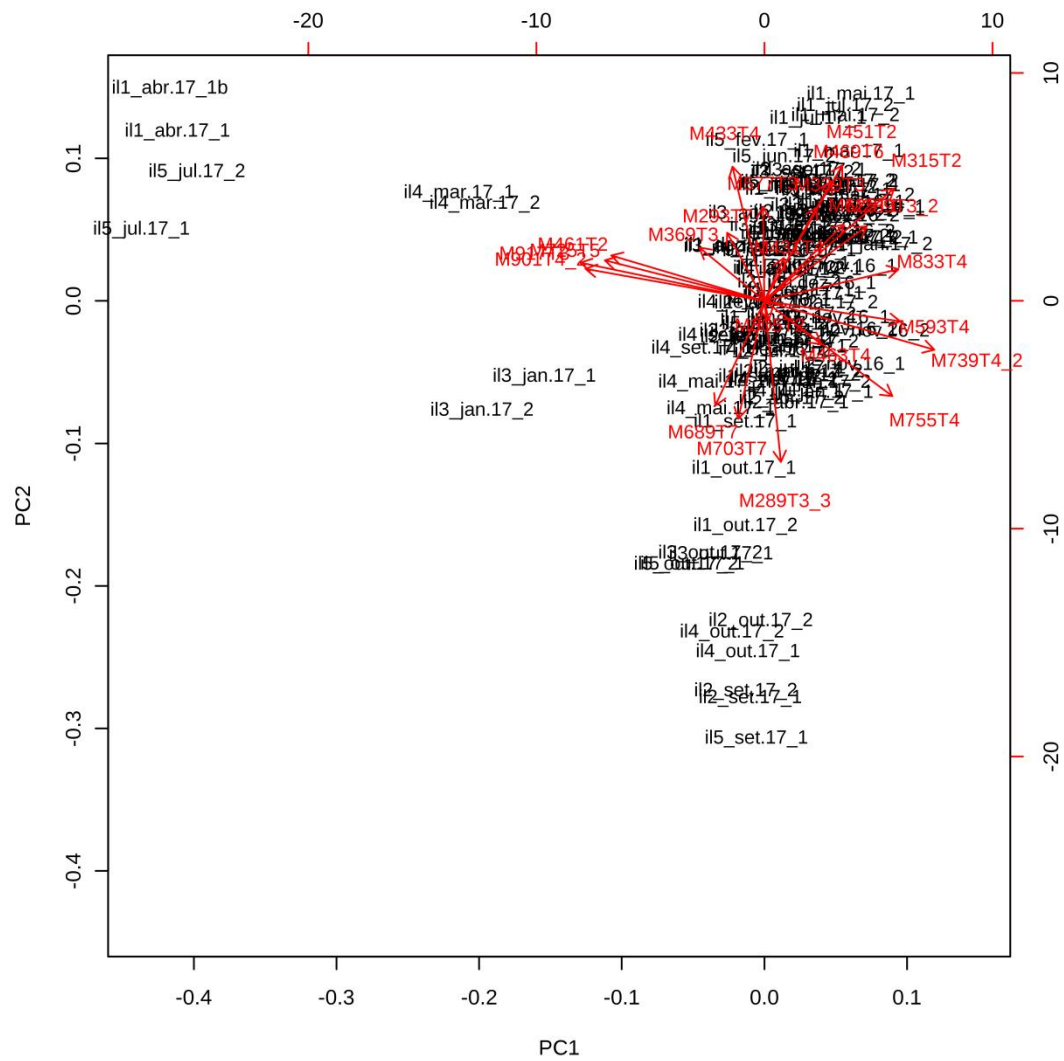
83. Costa, P. M. da *et al.* Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. *Toxicol. Vitro.* **22**, 854–863 (2008).
84. Horn, R. C. & Ferrão Vargas, V. M. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. *Mutagenesis* **18**, 113–118 (2003).
85. Queiroga, C. L., Silva, G. F., Dias, P. C., Possenti, A. & De Carvalho, J. E. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *J. Ethnopharmacol.* **72**, 465–468 (2000).
86. Queiroga, C. L. *et al.* Avaliação do potencial anticâncer de fração ativa antiulcerogênica de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). in *30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* 460–460 (2007).
87. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J Biochem Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
88. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. *Free radicals in biology and medicine*. (Oxford University Press., 1999).
89. Miller, D. M., Buettner, G. R. & Aust, S. D. Transition metals as catalysts of ‘autoxidation’ reactions. *Free Radic. Biol. Med.* **8**, 95–108 (1990).
90. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals , metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **160**, 1–40 (2006).
91. Odashima, M. *et al.* Selective adenosine A 2A receptor agonist , ATL-146e , attenuates stress-induced gastric lesions in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **20**, 275–280 (2005).
92. Caldas Filho, M. R. D. & Batista, L. M. Avaliação da atividade gastroprotetora de *Maytenus distichophylla* Mart. Ex Reissek (Celastraceae). (Universidade Federal da Paraíba, 2013).
93. Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **30**, 25–30 (1995).

94. Huang, D., Boxin, O. U. & Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841–1856 (2005).
95. Cabral, I. S. R., Oldoni, L. C., Prado, A., Bezerra, R. M. N. & Alencar, S. M. de A. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quim. Nov.* **32**, 1523–1527 (2009).
96. Ou, B., Hampsch-woodill, M. & Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical Absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4619–4626 (2001).
97. Prior, R. L. *et al.* Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3273–3279 (2003).
98. ANVISA. *Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira*. (2018).
99. Pereira, A. M. S., Januário, A. H., Queiroz, M. E. E., Biondo, R. & França, S. C. Evaluation of *Maytenus aquifolia* Mart. and *Maytenus ilicifolia* Mart. chemotypes for tannins, total phenols and triterpenes. *Rev. Bras. Plantas Med.* **8**, 13–17 (2005).
100. Roy, M. K. *et al.* ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **61**, 109–124 (2010).

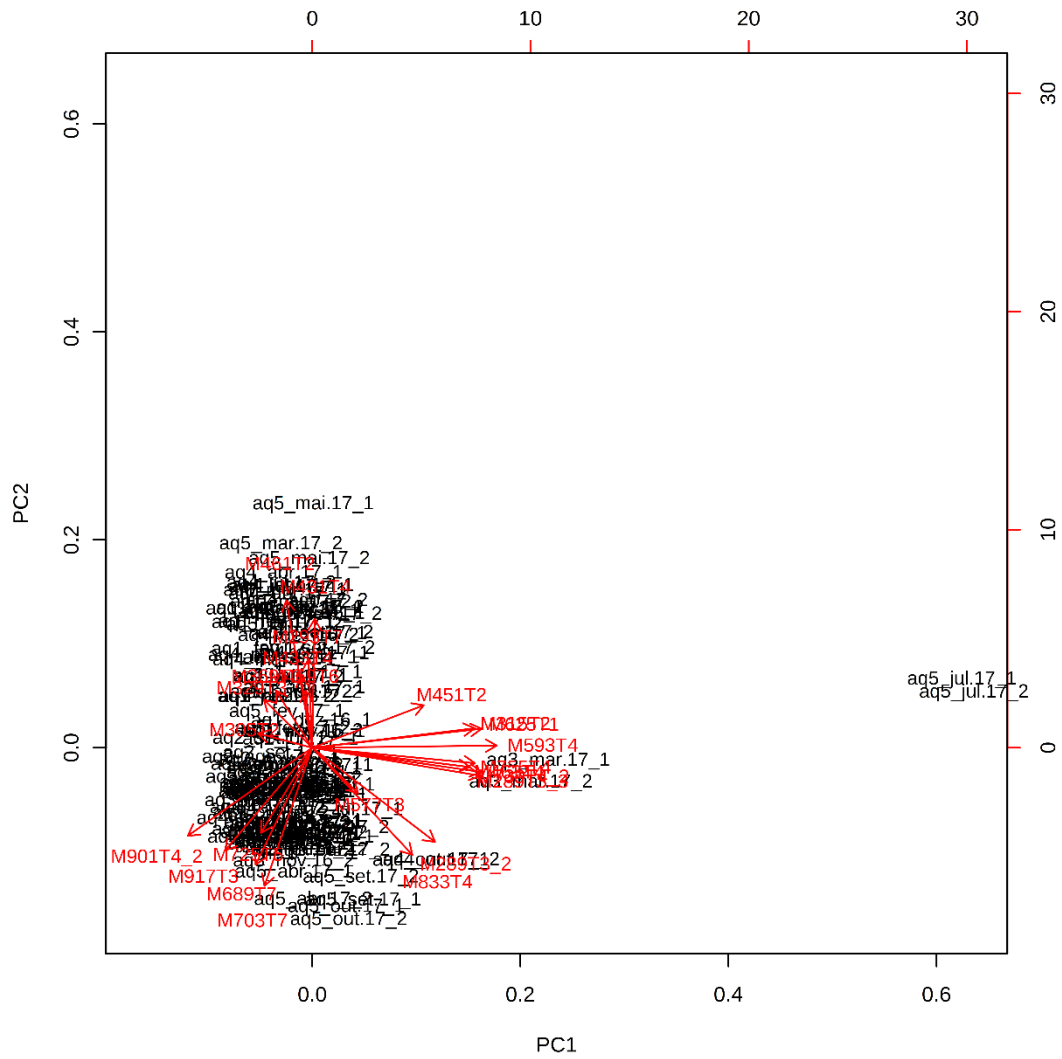
ANEXO

Anexo 1. Parâmetros determinados para o pré-processamento dos dados pelo software XCMS online. **FWHM:** full width at half maximum of matched filtration gaussian model peak; **step:** full width at half maximum of matched filtration gaussian model peak; **profStep:** step size (in m/z) to use for profile generation from the raw data files; **bw:** Allowable retention time deviations, in seconds. In more detail: bandwidth (standard deviation or half width at half maximum) of gaussian smoothing kernel to apply to the peak density chromatogram; **minfrac:** minimum fraction of samples necessary in at least one of the sample groups for it to be a valid group; **mzwid:** width of overlapping m/z slices to use for creating peak density chromatograms and grouping peaks across samples

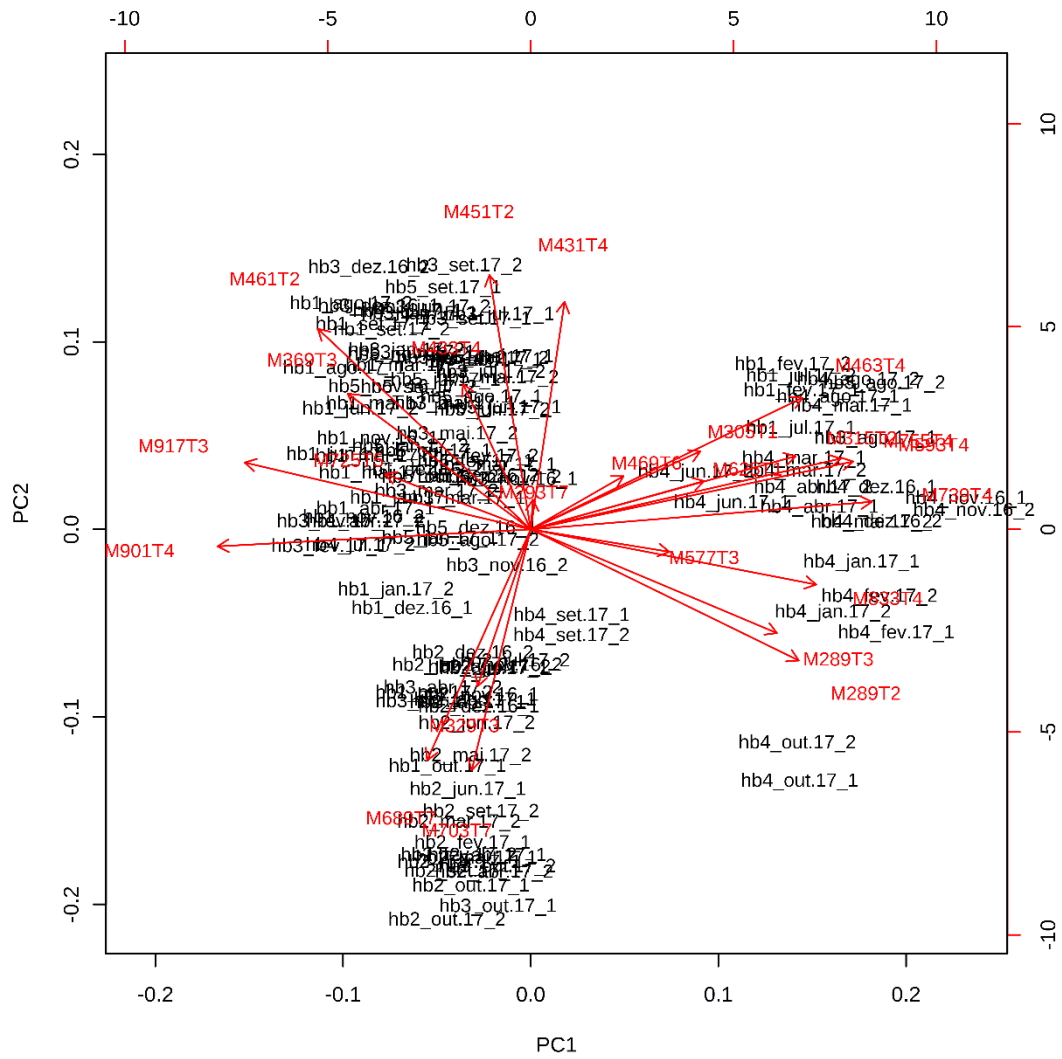
Feature Detection	
Method	matchedFilter
FWHM	10
step	0,5
Retention Time Correction	
Method	obiwarp
profStep	1
Alignment	
bw	10
minfrac	0,15
mzwid	0,25



Anexo 2. Biplot da PCA de *Maytenus ilicifolia*.



Anexo 3. Biplot da PCA de *Maytenus aquifolium*



Anexo 4. Biplot da PCA dos indivíduos Híbridos